

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sabina ŽALIG

**VPLIV FARMACEVTIKOV NA BAKTERIJSKO  
ZDRUŽBO V PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAVAH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Sabina ŽALIG

**VPLIV FARMACEVTIKOV NA BAKTERIJSKO ZDRUŽBO V  
PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAVAH**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**INFLUENCE OF PHARMACEUTICALS ON THE STRUCTURE OF  
BACTERIAL COMMUNITY IN PILOT WASTEWATER  
TREATMENT PLANTS**

M.SC. THESIS  
Master Study Programmes – Field Microbiology

Ljubljana, 2013

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

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico prof. dr. Ester Heath in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

## Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspotnig  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Članica: prof. dr. Ester Heath  
Ljubljana, Institut Jožef Stefan

Članica: prof. dr. Romana Marinšek Logar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Sabina Žalig

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
 DK UDK 579.25/.26:628.35:615.214(043)=163.6  
 KG mikrobnia ekologija/mikrobne združbe/lakaze/biološke čistilne naprave/odpadne vode/bioreaktorji/aktivno blato/farmakološke učinkovine/diazepam/DGGE  
 AV ŽALIG, Sabina, dipl. mikrobiol. (UN)  
 SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/HEATH, Ester (somentorica)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije  
 LI 2013  
 IN VPLIV FARMACEVTIKOV NA BAKTERIJSKO ZDRUŽBO V PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAVAH  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)  
 OP XII, 65 str., 12 pregl., 18 sl., 2 pril., 87 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Biološko čiščenje odpadne vode je eden izmed pomembnejših procesov v čistilnih napravah, kjer igrajo ključno vlogo bakterije. Vpliv farmacevtikov na bakterijsko združbo v aktivnem blatu čistilnih naprav ni dobro poznan. V nalogi smo proučevali vpliv farmacevtika diazepama (DZ) na strukturo in filogenetsko sestavo bakterijske združbe v aktivnem blatu pilotnih čistilnih naprav. Hkrati smo preverili tudi vpliv DZ na pestrost genov, ki kodirajo proteobakterijske lakaze, encime, ki imajo potencial za odstranjevanje farmacevtikov. Na podlagi profilov DGGE bakterijskih genov za 16S rRNA in lakaznih genov proteobakterij smo ugotovili, da je celotna bakterijska in proteobakterijska združba v kontrolnem bioreaktorju (R0) in v bioreaktorjih z dodatkom DZ (X1 in X2) ob koncu obratovanja pестra. Z analizo klonskih knjižnic gena za 16S rRNA smo sicer zajeli le 13-40 % ocenjene bakterijske pestrosti. Večino sekvenc nismo uspeli uvrstiti v rodove, primerjava knjižnic na nivoju debel pa je pokazala, da se razlike v učinkovitosti odstranjevanja DZ med dvema bioreaktorjem (25 % v X1 in 71 % v X2) ne odražajo v strukturi in filogenetski sestavi bakterijske združbe. V obeh bioreaktorjih smo zasledili prevlado predstavnikov iz debel *Proteobacteria* (predvsem *Betaproteobacteria*) in *Chloroflexi*. Analiza lakaznih genov proteobakterij je pokazala, da so se v obeh bioreaktorjih obogatile lakaze iz razreda *Alphaproteobacteria*. Predstavniki tega razreda so bili tretja najpogosteje zastopana skupina v knjižnicah genov za 16S rRNA iz aktivnega blata obeh bioreaktorjev. Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da so za večji preskok v učinkovitosti razgradnje DZ v bioreaktorju X2 odgovorni mikroorganizmi, ki predstavljajo manjšinski delež združbe in jih z uporabljenimi metodami nismo uspeli identificirati. Relativno visoka pestrost bakterij v bioreaktorjih z dodatkom DZ kaže tudi na to, da DZ v preučevani koncentraciji (100 µg/l) ni toksičen za bakterije v aktivnem blatu čistilnih naprav.

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2  
 DC UDC 579.25/.26:628.35:615.214(043)=163.6  
 CX microbial ecology/microbial communities/laccases/biological wastewater treatment plants/wastewater/bioreactors/activated sludge/pharmaceutical residues/diazepam/DGGE  
 AU ŽALIG, Sabina  
 AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/HEATH, Ester (co-advisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology  
 PY 2013  
 TI INFLUENCE OF PHARMACEUTICALS ON THE STRUCTURE OF BACTERIAL COMMUNITY IN PILOT WASTEWATER TREATMENT PLANTS  
 DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes – Field Microbiology)  
 NO XII, 65 p., 12 tab., 18 fig., 2 ann., 87 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Biological wastewater treatment is one of the most important processes in wastewater treatment plants, where bacteria play an important role. Influence of pharmaceuticals on bacterial community in activated sludge treatment plant is not well understood. We aimed to investigate the influence of pharmaceutical diazepam (DZ) on the structure and phylogenetic composition of bacterial community in the activated sludge of pilot wastewater treatment plants, using fingerprinting (DGGE) and cloning approach. In addition, by using DGGE, we investigated the impact of DZ on diversity of genes encoding putative proteobacterial laccases, enzymes that have the potential to degrade pharmaceuticals. Based on DGGE profiles of bacterial 16S rRNA genes and genes for proteobacterial laccases we concluded DZ did not have a strong influence on bacterial community. At the end of operation diversity of the total bacterial and proteobacterial community in bioreactors with the addition of DZ (X1 and X2) was similar to the one in the control bioreactor (R0). The clone libraries covered only 13-40 % of the estimated bacterial diversity, which allowed only a partial insight into the respective bacterial communities. The two bacterial communities showed a similar structure and phylogenetic composition despite significant difference in activity between two bioreactors (25 % in X1 and 71 % in X2). *Proteobacteria* (mainly *Betaproteobacteria*) and *Chloroflexi* dominated in both bioreactors. Proteobacterial laccase genes showed a similar trend with an enrichment of laccase genes of *Alphaproteobacteria*. Representatives of this class were the third most represented group in the libraries of the 16S rRNA gene from both bioreactors. Based on these results we speculate that rare taxa, that are not identifiable by methods used, are responsible for the difference in degradation of DZ in the two bioreactors. Relatively high diversity of bacteria in bioreactors with the addition of DZ also indicates that DZ in studied concentration (100 µg/l) is not toxic for bacteria in activated sludge treatment plants.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PRISOTNOST FARMACEVTIKOV V OKOLJU .....	3
<b>2.1.1 Diazepam .....</b>	<b>3</b>
2.1.1.1 Mehanizem delovanja diazepama.....	4
2.1.1.2 Koncentracije diazepama v okolju .....	6
2.2 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINKI FARMACEVTIKOV .....	6
<b>2.2.1 Vpliv diazepama na vodne organizme .....</b>	<b>6</b>
2.3 ODSTRANJEVANJE FARMACEVTIKOV IZ ODPADNIH VODA.....	7
2.4 DELOVANJE ČISTILNIH NAPRAV .....	8
<b>2.4.1 Mikrobne združbe čistilnih naprav .....</b>	<b>8</b>
2.4.1.1 Funkcija bakterij pri čiščenju odpadnih vod.....	9
2.4.1.2 Funkcija mikrobnih encimov pri razgradnji organske snovi .....	10
2.5 LAKAZE IN NJIHOVA UPORABA V BIORREMEDIACIJI.....	10
<b>2.5.1 Struktura in delovanje lakaz .....</b>	<b>11</b>
<b>2.5.2 Vrste lakaz in njihova ekološka vloga.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5.3 Bakterijske lakaze.....</b>	<b>13</b>
<b>2.5.4 Razgradnja farmacevtikov z glivnimi lakazami .....</b>	<b>14</b>
2.6 BIORAZGRADNJA DIAZEPAMA V ODPADNIH VODAH.....	14
<b>2.6.1 Karakteristike pilotne čistilne naprave za odstranjevanje diazepama .....</b>	<b>16</b>

<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 MATERIALI .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.1 Laboratorijska oprema in pripomočki .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Reagenti in drobna oprema .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Pufri in raztopine .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.4 Gojišča.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.5 Bakterijski sevi.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.6 Plazmid pGEM®-T Easy .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.7 Začetni oligonukleotidi .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1 Pilotna čistilna naprava: vzorčenje in kemijska analiza .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2 Molekularno biološke metode.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2.1 Izolacija DNA iz aktivnega blata bioreaktorjev .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2.2 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA v verižni reakciji s polimerazo .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.3 Pomnoževanje bakterijskih lakaznih genov in lakaznih genov proteobakterij v verižni reakciji s polimerazo .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2.4 Izvedba agarozne gelske elektroforeze.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2.5 Analiza produktov PCR z elektroforezo v gradientu denaturanta .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja genov za lakaze proteobakterij.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2.7 Priprava knjižnic gena za 16S rRNA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.3 Bioinformacijske metode.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3.1 Analiza profilov DGGE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.3.2 Analiza nukleotidnih zaporedij.....</b>	<b>32</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 IZOLACIJA DNA IZ AKTIVNEGA BLATA BIOREAKTORJEV .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 VPLIV DIAZEPAMA NA STRUKTURO IN SESTAVO BAKTERIJSKE ZDRUŽBE .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1 Spremembe v strukturi bakterijske združbe bioreaktorjev med enoletnim obratovanjem .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.2 Raznolikost bakterijske združbe bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2.3 Sestava bakterijske združbe aktivnega blata bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 VPLIV DIAZEPAMA NA RAZNOLIKOST GENOV ZA LAKAZE PROTEOBAKTERIJ .....</b>	<b>45</b>

<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 RAZPRAVA.....</b>	<b>50</b>
<b>5.1.1 Vpliv diazepama na strukturo bakterijske združbe .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.2 Vpliv diazepama na sestavo bakterijske združbe .....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.3 Vpliv diazepama na raznolikost genov za lakaze proteobakterij .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 SKLEPI.....</b>	<b>55</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>56</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>57</b>

**ZAHVALA****PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti diazepamov in njegovih presnovkov (povzeto po Olkkola in Ahonen, 2008; Goodkin, 2010; Kosjek in sod., 2012).....	5
Preglednica 2: Fizikalno-kemijski parametri v bioreaktorjih (Kosjek in sod., 2012). ....	16
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema. ....	18
Preglednica 4: Uporabljeni laboratorijski pripomočki. ....	19
Preglednica 5: Uporabljeni reagenti. ....	20
Preglednica 6: Genotip sevov DH5 $\alpha$ in JM109 bakterije <i>E. coli</i> . ....	23
Preglednica 7: Uporabljeni začetni oligonukleotidi. ....	24
Preglednica 8: Učinkovitost odstranjevanja diazepamov (DZ) v aerobnih bioreaktorjih (X1, X2) tekom enoletnega obratovanja.....	26
Preglednica 9: Osnovni PCR protokoli. ....	28
Preglednica 10: Porazdelitev sekvenč in operativnih taksonomskih enot (OTE) klonskih knjižnic (X1A, X1B, X2A, X2B) po filogenetskih skupinah.....	39
Preglednica 11: Vrstna bogatost (indeks Chao) in raznolikost (indeksa Shannon in Simpson) gena za 16S rRNA v genskih knjižnicah (X1A, X1B, X2A, X2B) iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja pri 3 % evolucijskih razdaljah.....	42
Preglednica 12: Filogenetska umestitev lakaznim genom podobnih sekvenč, ki smo jih pridobili iz lis poliakrilamidnega gela (Slika 17), z uporabo algoritma BLAST. ....	48

## KAZALO SLIK

Slika 1: Poraba diazepama (10 mg) po območnih enotah Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS) v definiranih dnevnih odmerkih na 1000 prebivalcev na dan (DDD) v obdobju 2002-2004 (Fürst in sod., 2006).....	4
Slika 2: Shematski prikaz katalitične funkcije lakaz v prisotnosti mediatorja (Morozova in sod., 2007) .....	12
Slika 3: Učinkovitost biorazgradnje diazepama po 45 tednih obratovanja bioreaktorjev (A: aerobno, B: anaerobno → aerobno, C: aerobno → anaerobno) (Kosjek in sod., 2012).....	15
Slika 4: Shema plazmida pGEM®-T Easy (Promega Corporation, 2010).....	23
Slika 5: Hodogram eksperimenta. ....	25
Slika 6: Vzorci izolirane celokupne DNA iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu .....	34
Slika 7: S PCR pomnožena V3 regija bakterijskih genov za 16S rRNA iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu.. ....	35
Slika 8: Profili DGGE delnih zaporedij gena za 16S rRNA bakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja. ....	36
Slika 9: Primerjava profilov DGGE delnih zaporedij gena za 16S rRNA bakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0).....	37
Slika 10: Delna zaporedja gena za 16S rRNA bakterij iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja (w66), ki smo jih uporabili v pripravi knjižnic genov, pred (levo) in po čiščenju (desno). ....	38
Slika 11: Delež zaporedij gena za 16S rRNA, pridobljenih iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja, po bakterijskih deblih. ....	40
Slika 12: Vennov diagram, izrisan pri 3 % evolucijskih razdaljah, ki kaže razporeditev operativnih taksonomskih enot (OTE) po knjižnicah (X1A, X1B, X2A, X2B).. ....	40
Slika 13: Nabiralčeve krivulje zaporedij gena za 16S rRNA iz genskih knjižnic bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja, izrisane pri 3 %, 5 % in 20 % evolucijskih razdaljah. ....	41
Slika 14: Filogenetsko drevo zaporedij gena za 16S rRNA bakterij, ki smo jih pridobili iz bioreaktorjev X1 (genski knjižnici X1A in X1B) in X2 (genski knjižnici X2A in X2B), izdelano z metodo največjega verjetja v programu ARB. ....	44

Slika 15: S PCR pomnoženi bakterijski lakazni geni iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu .....	45
Slika 16: S PCR pomnoženi lakazni geni proteobakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu .....	45
Slika 17: Profili DGGE delnih zaporedij gena za lakaze proteobakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja. ....	46
Slika 18: Primerjava profilov DGGE delnih lakaznih genov proteobakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0). ....	47

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Raznolikost bakterijskih genov za 16S rRNA v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in v kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja.

Priloga B: Raznolikost genov za lakaze proteobakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in v kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16 S rRNA	ribonukleinska kislina male podenote ribosoma (ang. small subunit ribosomal ribonucleic acid)
AB	aktivno blato
bp	bazni par
BČN	biološka čistilna naprava
DGGE	elektroforeza v denaturirajočem gradientu (ang. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DZ	diazepam
KPK	kemijska potreba po kisiku
MBR	membranski bioreaktor
MLSS	koncentracija sušine v aeracijskem bazenu (ang. mixed liquor suspended solids)
NH <sub>4</sub> -N	amonijak
NO <sub>2</sub> -N	nitrit
NO <sub>3</sub> -N	nitrat
OTE	operativne taksonomske enote
OV	odpadna voda
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

## 1 UVOD

V zadnjem desetletju vse več pozornosti namenjamo pojavnosti in možnim toksičnim učinkom ostankov farmacevtikov v okolju. Le ti vstopajo v okolje z odpadnimi vodami iz farmacevtskih industrij, bolnišnic ali gospodinjstev oz. zaradi nepravilnega odlaganja neuporabljenih zdravil (Kosjek in sod., 2005). Njihov vpliv na človeka je natančno preučen v kliničnih in predkliničnih študijah v fazah razvoja in testiranja, medtem ko so njihovi vplivi, odzivi in usoda v okolju šele v zadnjem desetletju pritegnili znanstveno in javno pozornost (Kosjek in sod., 2009a).

Farmacevtiki so pretežno sintetične spojine izdelane z namenom, da sprožijo farmakološki odgovor na specifičnem mestu delovanja v tarčnem organizmu, zato morajo biti kemično stabilni, da lahko dosežejo ta mesta v nespremenjeni obliki (Kosjek in sod., 2009a). Metabolna stabilnost farmacevtikov se lahko pokaže kot obstojnost v okolju in neučinkovita odstranitev med čiščenjem odpadnih vod, kar predstavlja breme za okolje (Kosjek in sod., 2005; Kosjek in sod., 2009a). Številne farmacevtike so zaznali v površinskih vodah, v podtalnici in celo v pitni vodi v koncentracijah od ng/l do nekaj µg/l (Fent in sod., 2006; Fent, 2008). Koncentracije farmacevtikov v vodah so za enkrat tri do štirikrat nižje od potrebnih za vzpostavitev farmakološkega učinka pri ljudeh (Christensen, 1998). Verjetnost za akutno zdravstveno tveganje pri ljudeh je torej nizko, kljub temu pa ne gre zanemariti možnih učinkov zaradi dolgotrajne, doživljenjske izpostavitve tem snovem (Christensen, 1998).

Zaskrbljenost glede onesnaženja okolja s farmacevtskimi izdelki je vedno večja zaradi njihove razširjene uporabe in nepopolne odstranitve med čiščenjem odpadnih vod, kjer igrajo ključno vlogo mikroorganizmi. Da bi lahko oblikovali stabilne in učinkovite sisteme za čiščenje odpadnih vod, je ključno razumevanje strukture in stabilnosti mikrobine združbe, kot tudi njenega odziva na farmacevtike v odpadnih vodah (Kraigher in sod., 2008; Kraigher in Mandić-Mulec, 2011). Poleg tega je pomembno, kateri encimi bi lahko potencialno razgrajevali in transformirali farmacevtike. Potencialni kandidati so tudi bakterijske lakaze, ki so okoljsko pomembni mikrobeni encimi (Ausec in sod., 2011a; Ausec in sod., 2011b) in ki imajo potencial za odstranjevanje novih onesnaževal kot so farmacevtiki (Majeau in sod., 2010).

Narejene so bile številne raziskave glede pojavnosti farmacevtikov v vodnem okolju, vendar je naše poznavanje njihove usode v okolju in mikrobine transformacije še vedno pomanjkljivo (Kosjek in sod., 2009a). Odgovori na ta vprašanja so ključni za določitev ocene tveganja in izboljšanje čistilnih tehnologij odpadnih vod (Kosjek in sod., 2007; Kosjek in sod., 2009a).

### 1.1 NAMEN DELA

Zanimal nas je vpliv farmacevtika diazepama na strukturo bakterijske združbe in na raznolikost genov, ki kodirajo bakterijske lakaze, v vzorcih iz pretočnih pilotskih bioreaktorjev, ki so jih oblikovali Kosjek in sod. (2012) za proučevanje biorazgradnje benzodiazepinov v odpadnih vodah.

V ta namen smo s pomočjo molekularno bioloških metod skušali identificirati in primerjati sestavo bakterijske združbe v pretočnih pilotskih bioreaktorjih. Zanimalo nas je, katere bakterijske vrste se pojavljajo v posameznem bioreaktorju in katere so najbolj pogoste. Istočasno smo z identifikacijo bakterijskih lakaznih genov želeli preveriti njihovo prisotnost in raznolikost v posameznih bioreaktorjih.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Glede na to, da je mikrobiološka razgradnja pomemben korak v čiščenju odpadnih vod smo predvidevali, da se povečanje učinkovitosti odstranjevanja diazepama iz odpadnih vod odraža na strukturi bakterijske združbe in postavili:

1. Hipotezo: Prisotnost diazepama vpliva na strukturo in raznolikost bakterijske združbe v aktivnem blatu bioreaktorja.

Diazepam je derivat benzena in bi kot tak lahko bil substrat za oksidazne encime bakterij, kot so npr. lakaze. Predpostavili smo, da se bo prisotnost diazepama odražala tudi v pestrosti lakaznih genov bakterij in postavili:

2. Hipotezo: Prisotnost diazepama vpliva na raznolikost lakaznih genov bakterij v aktivnem blatu bioreaktorja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PRISOTNOST FARMACEVTIKOV V OKOLJU

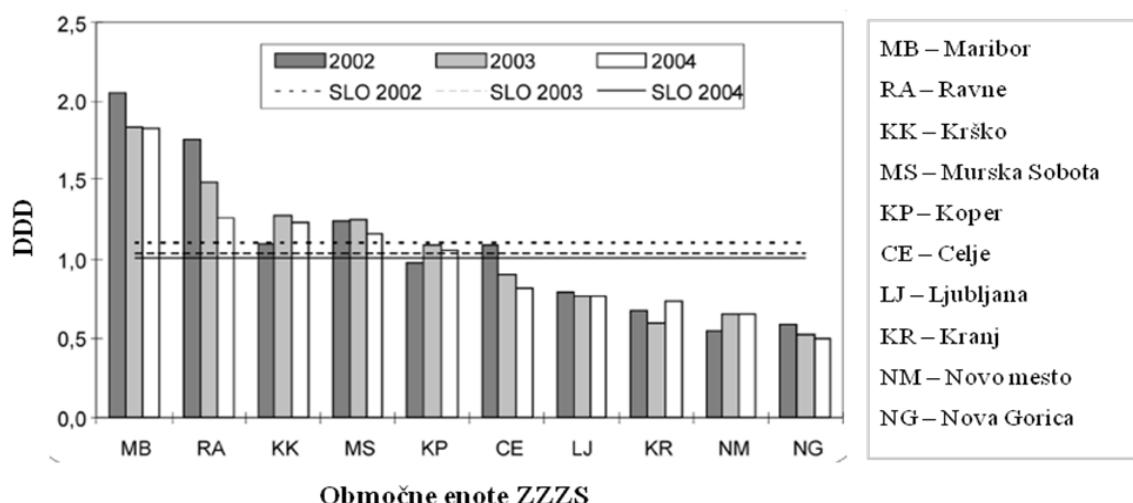
Farmacevtiki oz. farmacevtsko aktivne spojine so zdravila, ki se uporablja za preprečevanje, diagnostiko ali zdravljenje bolezni ljudi in živali (Kümmerer, 2008; Monteiro in Boxall, 2010). V Evropski uniji (EU) se za namene humane medicine uporablja okoli 3000 različnih farmacevtikov, kot so analgetiki in protivnetna zdravila, kontracepcijska sredstva, antibiotiki, beta blokatorji, lipidni regulatorji, psihoaktivne spojine in mnogi drugi. Prav tako se veliko farmacevtikov uporablja v veterini, med njimi predvsem antibiotiki in protivnetna zdravila (Fent in sod., 2006). Vzorec porabe farmacevtskih izdelkov je v različnih državah različen, celokupno gledano pa poraba narašča, zato jih uvrščamo med nova onesnažila okolja. Nevarnost za okolje ne predstavlja sama masovna proizvodnja farmacevtikov, ampak predvsem njihova obstojnost v okolju in možni negativni učinki (npr. visoka toksičnost, učinki na ključne biološke funkcije kot je reprodukcija) (Fent in sod., 2006). Zaradi naraščanja svetovne populacije, staranja prebivalstva in načina življenja lahko pričakujemo, da se bo v bodoče njihova poraba še povečala (Kümmerer, 2008; Verlicchi in sod., 2012).

Po uporabi se farmacevtiki izločajo v nespremenjeni obliki ali v obliki presnovkov ter na različne načine vstopajo v okolje. Od človeka prihajajo v okolje preko komunalnih odpadnih vod in z odlaganjem neporabljenih zdravil. Velike koncentracije farmacevtikov vsebujejo tudi odpadne vode iz bolnišnic in proizvodnje ter izcedne vode iz odlagališč odpadkov (Fent in sod., 2006). Zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti so lahko nekateri farmacevtiki zelo obstojni, kar otežuje čiščenje odpadnih vod (OV) v čistilnih napravah pred izpustom v okolje. Posledica je onesnaženje površinskih voda, lahko pa tudi podtalnice in pitne vode. V primeru uporabe blata iz čistilne naprave za gnojenje kmetijskih površin lahko prihaja do kontaminacije tal. Poleg tega lahko v okolje vstopajo farmacevtiki, ki se uporablja v veterini, in sicer z aplikacijo gnojevke na polja in odtekanjem v podzemne in površinske vode ter z neposredno uporabo farmacevtikov v ribogojstvu (Fent in sod., 2006).

#### 2.1.1 Diazepam

Diazepam (DZ) je farmacevtik iz skupine benzodiazepinov, ki se uporablja za zdravljenje anksioznosti in sorodnih čustvenih motenj, motenj spanja in epilepsije. Uporablja se tudi kot centralno delujoči mišični relaksant, za premedikacijo in kot inducijsko sredstvo v anesteziologiji (Kosjek in sod., 2012). Čezmerna uporaba lahko vodi v razvoj tolerance in zasvojenosti, možne pa so tudi zlorabe (Fürst in sod., 2006).

Povprečna letna evropska poraba DZ v obdobju 1995 – 2003 je bila približno 6300 kg (Straub, 2008). V Sloveniji je DZ drugi najpogosteje predpisani anksiolitik. Poraba narašča s starostjo in je primerljiva porabi v skandinavskih državah (Fürst in sod., 2006). Podatki za Slovenijo so pokazali velike razlike v predpisovanju DZ med posameznimi regijami. Razlika med najnižjo porabo v Območni enoti Nova Gorica in najvišjo porabo v Območni enoti Maribor je bila v obdobju 2002 – 2004 skoraj štirikratna (Slika 1). Zaradi poostrenih smernic za predpisovanje anksiolitikov je v istem obdobju povprečna poraba DZ v Sloveniji upadla za 8 % (Fürst in sod., 2006).



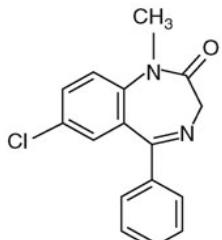
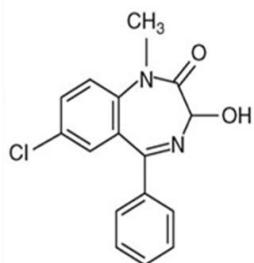
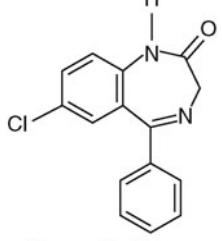
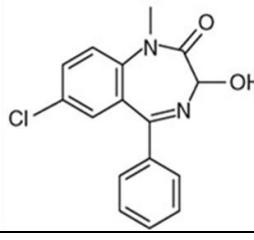
**Slika 1:** Poraba diazepama (10 mg) po območnih enotah Zavoda za zdravstveno zavarovanje Slovenije (ZZZS) v definiranih dnevnih odmerkih na 1000 prebivalcev na dan (DDD) v obdobju 2002-2004. Vodoravne črte kažejo slovensko povprečje v navedenih letih (Fürst in sod., 2006).

### 2.1.1.1 Mehanizem delovanja diazepama

DZ (s tržnim imenom Valium oz. Apaurin) so za namene humane medicine razvili pri Hoffmann - La Roche Ltd. leta 1960. Primeren je za peroralno, intravenozno, intramuskularno in rektalno uporabo (Goodkin, 2010). Predpisan peroralni dnevni odmerek je 10 mg na pacienta, največji dovoljeni dnevni odmerek pa znaša 60 mg (Straub, 2008). Po zaužitju se DZ hitro absorbira iz prebavil in doseže tarčno mesto delovanja, ki je receptor  $\gamma$ -aminobutanojske kisline (GABA) v centralnem živčnem sistemu. Vezava DZ nanj mu spremeni konformacijo in s tem poveča afiniteto vezave nevrotransmiterja GABA. Ta nato deluje kot inhibitor in zmanjša vzdraženost nevronov (Fent in sod., 2006; Olkkola in Ahonen, 2008; Goodkin, 2010). Blago zaviranje vzdraženosti nevronov zmanjša občutek tesnobe pri pacientu, medtem ko lahko izrazitejša inhibicija inducira splošno anestezijo.

Zaradi visoke biološke dostopnosti (85–100 %) začne DZ delovati že 30–90 minut po zaužitju (Goodkin, 2010). Njegovo delovanje je dolgotrajno zaradi dolge razpolovne dobe (Kosjek in sod., 2012). Po presnovi v jetrih se odstrani iz telesa. Reakcije biotransformacije katalizira citokrom P450. DZ se najprej presnovi v bodisi temazepam ali nordazepam (Preglednica 1). V naslednjem koraku se temazepam demetilira, nordazepam pa 3-hidroksilira v oksazepam (Straub, 2008). Prisotnost hidroksilne skupine omogoča hitro glukuronidacijo oksazepama, ki se izloča z urinom (Straub, 2008; Kosjek in sod., 2012).

**Preglednica 1:** Fizikalno-kemijske lastnosti diazepama in njegovih presnovkov (povzeto po Olkkola in Ahonen, 2008; Goodkin, 2010; Kosjek in sod., 2012).

Ime	Molekulska formula	Strukturna formula	Molska masa (g/mol)	Razpolovna doba (h)
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> OCl		284	20–100
Temazepam	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl		300	8–22
Nordazepam	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> OCl		270	30–200
Oksazepam	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl		286	4–15

### 2.1.1.2 Koncentracije diazepama v okolju

Analize so pokazale, da se z urinom izloči med 5 in 50 % količine zaužitega DZ oz. njegovih presnovkov (Straub, 2008). Manjši delež DZ (< 1 %) prihaja v okolje z izpusti ob proizvodnji. Najviše koncentracije DZ so zasledili v odplakah iz komunalnih čistilnih naprav (do 660 ng/l), na odlagališčih smeti (do 500 ng/l) in v OV iz bolnišnic (do 111 ng/l). DZ so zasledili tudi v površinski (do 62 ng/l), podzemni in pitni vodi (do 10 ng/l) (povzeto po Fent, 2008; Straub, 2008; Kosjek in sod., 2012).

## 2.2 EKOTOKSIKOLOŠKI UČINKI FARMACEVTIKOV

Trenutne raziskave so usmerjene predvsem v razvoj metod za zaznavanje farmacevtikov in njihovih presnovkov v okolju. Za razliko od poznavanja okoljskih koncentracij je le malo znanega o toksikoloških učinkih farmacevtskih izdelkov na organizme. Zlasti vodni organizmi so še posebej pomembne tarče, saj so ostankom farmacevtikov v OV izpostavljeni ves čas svojega življenja (Fent in sod., 2006; Fent, 2008).

Šele v zadnjih nekaj letih so regulativne agencije izdelale smernice o oceni možnih neželenih učinkov farmacevtikov na okolje. Evropska komisija je objavila smernice (Directive 2001/83/EC), ki določajo, da je potrebno dovoljenju za promet s farmacevtskimi izdelki priložiti še oceno tveganja za okolje. Leta 2006 je Evropska agencija za zdravila (EMEA 2006) izdelala smernice za ocenjevanje možnih tveganj farmacevtikov za okolje. Gre za večfazni postopek z uporabo testov akutne toksičnosti za oceno učinka. Med njimi so testi OECD (ang. observed effect concentration definition) kot je npr. zaviranje rasti alg, učinek na razmnoževanje vodne bolhe *Daphnia magna* in toksičnost za ribe v zgodnjih življenjskih stadijih (Fent, 2008).

Dostopnih informacij o vplivu farmacevikov na vodne organizme je vedno več, vendar še zmeraj premalo. Za večino analiziranih humanih farmacevtikov so akutni učinki na vodne organizme malo verjetni, razen v primeru razlitij (Fent, 2008). Pri kroničnih učinkih bi lahko bila situacija drugačna, vendar pa trenutno o tem primanjkuje informacij. Zato se je v bodoče potrebno osredotočiti na ocenjevanje vpliva farmacevtikov ob dolgoročni izpostavljenosti za celovito oceno nevarnosti in tveganja, kjer je potrebno upoštevati še sinergistične in aditivistične učinke (Fent in sod., 2006; Fent, 2008).

### 2.2.1 Vpliv diazepama na vodne organizme

DZ velja za potencialno škodljivo spojino za vodne organizme, saj so koncentracije za akutno toksičnost manjše od 100 mg/l (Commission Directive 93/67/EEC). Učinek na

vodno bolho *Daphnia magna* je 2–45 krat večji kot na druge vrste, vendar razlog za večjo občutljivost ni znan (Fent in sod., 2006; Fent, 2008; Verlicchi in sod., 2012). Zanimivo je, da že nizke koncentracije DZ izzovejo pri embrijih ribice *Danio rerio* obraten odziv, tj. pospešeno plavanje namesto pomiritve, medtem ko je odziv odraslih ribic podoben kot pri človeku (Oggier in sod., 2010).

Za enkrat so najvišje koncentracije DZ v OV za  $10^7$  manjše od najnižjih vrednosti letalnih koncentracij ( $LC_{50}$ ), zato je tveganje za akutno toksičnost malo verjetno (Fent, 2008). Vendar pa ne gre zanemariti dejstva, da se zaradi stabilnosti in prekomerne uporabe DZ in njegovi presnovki v okolju kopičijo. Gre za halogenirane spojine, katerih razgradnja je otežena, zato je iskanje novih načinov čiščenja OV zelo pomembno.

## 2.3 ODSTRANJEVANJE FARMACEVTIKOV IZ ODPADNIH VODA

Koncentracije farmacevtikov v neobdelanih OV na vtokih čistilnih naprav se gibljejo med  $10^{-3}$  in  $10^2 \mu\text{g/l}$  (Verlicchi in sod., 2012). Te vrednosti predstavljajo izviv za čistilne naprave, ki večinoma niso opremljene za odstranjevanje kompleksnih farmacevtiskih aktivnih spojin, saj monitoring teh snovi ni zakonsko predpisan. Njihov glavni cilj je predvsem odstranjevanje enostavno ali zmerno razgradljivih ogljikovih, dušikovih in fosforjevih spojin (Verlicchi in sod., 2012). Čeprav v literaturi lahko zasledimo posamezne primere uspešne odstranitve farmacevtikov iz OV, je učinkovitost odstranjevanja teh snovi še vedno nizka, tj.  $< 50\%$  (Jelic in sod., 2011; Verlicchi in sod., 2012). V izpustih iz čistilnih naprav tako še zmeraj zaznamo koncentracije farmacevtikov v razponu od 1 ng/l do nekaj  $\mu\text{g/l}$  (Fent, 2008; Kümmerer, 2008).

Učinkovitost odstranjevanja farmacevtika iz OV je odvisna od lastnosti farmacevtika, izvora, sestave in količine OV ter karakteristik čistilne naprave (Sipma in sod., 2010). Predvsem je pomembna biološka stopnja čiščenja, kjer se farmacevtiki odstranijo bodisi z adsorpcijo na biomaso ali pa se razgradijo z mikrobnimi encimi. Adsorpcija je odvisna od hidrofobnih in elektrostatičnih interakcij farmacevtika s trdnimi delci in mikroorganizmi. Pri tem je pomemben tudi pH. Pri nevtralnem pH imajo kisli farmacevtiki (npr. ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak) negativen naboj in ostajajo v vodni fazi, zato adsorpcija ni glavni način odstranjevanja teh farmacevtikov iz OV. Pri istem pH imajo bazični farmacevtiki (npr. fluorokinolonski antibiotiki, estrogeni) pozitiven naboj in se lahko vežejo na biomaso v pomembnem obsegu ter na ta način odstranijo iz OV (Fent in sod., 2006). Z adsorpcijo na biomaso se sicer zmanjša onesnaženje OV, vendar pa na ta način farmacevtikov ne odstranimo dokončno. Zato se zdi biorazgradnja še najbolj učinkovit način za odstranjevanje farmacevtikov iz OV. Tukaj je pomembna predvsem struktura farmacevtika, saj so spojine z esterskimi, nitrilnimi in alkoholnimi funkcionalnimi skupinami bolj dostopne za razgradnjo, medtem ko je razgradnja halogeniranih farmacevtikov in farmacevtikov z razvejano strukturo manj uspešna. Na splošno velja, da

biološka razgradnja farmacevtikov narašča s podaljševanjem hidravličnega zadrževalnega časa in s starostjo biomase (Fent in sod., 2006). Ker so čistilne naprave izpostavljenе sončni svetlobi, se lahko določen delež farmacevtikov razgradi tudi s fotolizo (Sipma in sod., 2010; Verlicchi in sod., 2012).

## 2.4 DELOVANJE ČISTILNIH NAPRAV

Čistilne naprave so namenjene čiščenju OV, ki so sestavljene iz različnega deleža komunalnih in industrijskih odplak. OV lahko vsebujejo za zdravje potencialno škodljive organske in anorganske snovi, ki jih je potrebno pred izpustom v okolje odstraniti. Popolno čiščenje OV vključuje fizikalne, biološke in kemijske procese znotraj primarnega, sekundarnega in terciarnega čiščenja. Končni cilj čiščenja je zmanjšanje organske obremenitve in onesnaževal v OV (Tchobanoglous in sod., 2003).

V primarni ali mehanski fazni čiščenja se uporabljajo samo fizikalne metode ločevanja večjih organskih in anorganskih delcev iz OV. Pri tem vodi še vedno ostanejo suspendirane in raztopljeni snovi, zato ima večina čistilnih naprav še sekundarno fazo čiščenja. V sekundarni oz. biološki fazni čiščenja igrajo ključno vlogo mikroorganizmi, ki lahko razgradijo organske snovi in jih uporabijo kot vir hrani. Nekatere čistilne naprave imajo še terciarno fazo čiščenja, kjer se s fizikalno-kemijskimi postopki precipitacije, filtracije in kloriranja zmanjša koncentracija fosfata, nitrita in nitrata (Tchobanoglous in sod., 2003).

Bioremediacija, tj. razgradnja raznovrstnih okoljskih onesnaževal z mikroorganizmi, je postala eno izmed najhitreje razvijajočih se področij za sanacijo okolja (Dua in sod., 2002). Mikroorganizmi lahko izkoriščajo naravno ali sintetično organsko snov kot vir energije in z lastnimi encimi razgradijo številne organske molekule po različnih katalitičnih poteh (Dua in sod., 2002).

### 2.4.1 Mikrobne združbe čistilnih naprav

Biološko čiščenje OV je eden izmed pomembnejših procesov v čistilnih napravah. Biološke čistilne naprave (BČN) so v prvi vrsti namenjene odstranjevanju enostavno razgradljivih organskih snovi, medtem ko je učinkovitost odstranitve kompleksnih organskih spojin manjša. V primeru mineralizacije se organska snov razgradi do vode, ogljikovega dioksida in anorganskih snovi. V večini primerov pa biorazgradnja pomeni splet reakcij, v katerih sodelujejo mikroorganizmi, ki povzročijo delno transformacijo organske snovi (Dua in sod., 2002; Kümmerer, 2008; Juwarkar in sod., 2010).

Biorazgradnja lahko poteka aerobno, v prisotnosti kisika, oziroma anaerobno, v odsotnosti kisika (Tchobanoglous in sod., 2003). Aerobno biološko čiščenje posnema samočistilno sposobnost naravnih vodnih ekosistemov (Dua in sod., 2002). Pri tem sodeluje kompleksna mikrobna združba bakterij, gliv, alg in praživali. Biomasa je lahko razpršena in tvori aktivno blato ali pa je pritrjena na membranskih filtrih (Henze in sod., 2002; Tchobanoglous in sod., 2003). Večina čistilnih naprav uporablja pri biološkem čiščenju postopke z aktivnim blatom (AB). Zaradi nizke koncentracije biomase in kratkih zadrževalnih časov AB v bioreaktorjih je oksidacija organskih spojin velikokrat nepopolna (Tchobanoglous in sod., 2003). Membranski bioreaktorji (MBR) so tukaj v prednosti, saj vsebujejo večjo količino biomase, ki se lahko zaradi daljšega zadrževalnega časa v bioreaktorju prilagodi na razmere in je tudi bolj obstojna. Zaradi velike količine težko dostopne organske snovi v biomasi je določen delež mikroorganizmov prisiljen v presnovo slabše razgradljivih spojin, kot so npr. farmacevtiki (Verlicchi in sod., 2012).

Učinkovitost čiščenja OV je v veliki meri odvisna predvsem od prisotne bakterijske združbe (Kümmerer, 2008). Slednja je običajno zelo raznolika, saj aerobne in anaerobne mikroniše omogočajo rast aerobnim, anaerobnim in fakultativno anaerobnim bakterijam. Hkrati je učinkovitost odstranjevanja organskih snovi iz OV odvisna od izražanja bakterijskih encimov, vpletenih v biorazgradnjo (Dua in sod., 2002).

#### 2.4.1.1 Funkcija bakterij pri čiščenju odpadnih vod

V zadnjem desetletju so razvili številne molekularne pristope, ki nam omogočajo proučevanje sestave in raznolikosti bakterijske združbe v BČN. V knjižnicah bakterijskih genov za 16S rRNA, pridobljenih iz AB aerobnih bioreaktorjev, so bile najpogosteje prisotne sekvene iz razredov *Alpha*-, *Beta*- in *Gammaproteobacteria* ter debel *Bacteroidetes* in *Actinobacteria* (Wagner in Loy, 2002). Za oblikovanje AB so pomembne predvsem filamentozne bakterije (npr. *Sphaerotilus* sp., *Leptothrix* sp., *Thiothrix* sp., *Nostocoida* sp.), ki tvorijo nekakšno ogrodje, na katerega se pritrdijo ostale bakterije, da se tvorijo t.i. flokule. Pomembna je ravno pravšnja količina filamentoznih bakterij, saj lahko slednje ob prevelikem številu povzročajo penjenje in slabše usedanje blata, kar vpliva na čiščenje in poslabša kvaliteto iztočne vode (Gray, 2004). Nedavne študije so pokazale, da so med filamentoznimi bakterijami v AB čistilnih naprav prisotni tudi predstavniki debla *Chloroflexi* (Björnsson in sod., 2002; Beer in sod., 2002; Kragelund in sod., 2007).

Na površini flokul najdemo heterotrofne bakterije, ki vršijo oksidacijo ogljikovih organskih spojin. V BČN najpogosteje najdemo po Gramu negativne heterotrofne proteobakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Sphaerotilus*, *Chromobacterium*, *Achromobacter* in *Alcaligenes* (Gray, 2004; Juwarkar in sod., 2010). Nitrifikacijo, aerobno oksidacijo amonija do nitrita in nato nitrita do nitrata, vršijo aerobne kemolitotrofne bakterije, ki poseljujejo površino flokul. Med amonij oksidirajočimi bakterijami v BČN se

najpogosteje omenjajo predstavniki rodu *Nitrosomonas*. Med bakterijami, ki oksidirajo nitrit do nitrata, pa v BČN prevladujejo predstavniki iz debla *Nitrospira* (Wagner in Loy, 2002). Nitrat pretvorijo do atmosferskega dušika denitrifikacijske bakterije, ki so fakultativno anaerobne ali anaerobne in poseljujejo notranjost flokul. Molekularne analize so pokazale, da so prevladujoči denitrifikatorji v BČN predstavniki rodov *Azoarcus* in *Thauera* (Wagner in Loy, 2002). Izmenjava aerobnih razmer z anaerobnimi omogoča mikrobeno odstranjevanje fosfatov s fosfat akumulirajočimi bakterijami iz rodov *Acinetobacter* in *Rhodococcus* (Wagner in Loy, 2002).

#### 2.4.1.2 Funkcija mikrobnih encimov pri razgradnji organske snovi

Rezultati analiz sestave bakterijske združbe v BČN sovpadajo z rezultati metagenomskeh analiz razširjenosti genov, ki kodirajo encime za razgradnjo organskih onesnaževal. Mikroben razgradnja vključuje veliko pomembnih kemijskih procesov, vključno z oksidacijo in redukcijo, ki jih vršijo za to specializirani encimi oksidoreduktaze (Shah in sod., 2012). Oksidoreduktaze imajo pomembno vlogo pri razgradnji organskih snovi. Običajno so to prvi encimi, ki delujejo na kompleksne spojine in s tem sprožijo njihovo razgradnjo (Shah in sod., 2012). Sposobnost bakterij, da razgradijo organska onesnaževala, pa je odvisna od izražanja genov, ki kodirajo te encime (Juwarkar in sod., 2010).

Z metagenomskim pristopom so Fang in sodelavci (2013) dokazali, da je v mikrobeni združbi AB najbolj zastopen gen *p450* (9,7–15,9 %), ki kodira monooksigenazo citokroma P450, ta pa je vpletena v razgradnjo olj, kloriranih ogljikovodikov, dodatkov za goriva in mnogih drugih spojin. Drugi najbolj pogost je bil gen *ppo* (8,8–15,5 %), ki kodira polifenol oksidazo oz. lakazo, slednja pa lahko razgrajuje fenolne spojine, med drugim tudi farmacevtike. Zaznali so 87 rodov, ki nosijo zapis za te encime, in jih uvrstili v 9 bakterijskih debel, večino med *Proteobacteria* (59,8 %), *Bacteroidetes* (17,2 %) in *Actinobacteria* (9,2 %). Izkazalo se je, da je 11,5–40,0 % encimov za biorazgradnjo kodiranih na plazmidih, zato predvidevajo, da se lahko zapisi zanje prenašajo horizontalno med bakterijskimi vrstami (Fang in sod., 2013; Ausec in sod., 2011b).

### 2.5 LAKAZE IN NJIHOVA UPORABA V BIOREMEDIACIJI

V iskanju učinkovitih zelenih tehnologij za čiščenje OV je naraslo zanimanje za oksidacijske encime, s katerimi bi nadomestili konvencionalne ne-biološke metode čiščenja. Med različnimi obstoječimi oksidoreduktazami so v zadnjem desetletju center intenzivnih raziskav postale lakaze, ki imajo številne prednosti za uporabo v čistilnih tehnologijah. Nizka substratna specifičnost jim omogoča oksidacijo velikega števila različnih spojin. Zaradi izločanja iz celic so postopki čiščenja nezahtevni, v okolju pa so

relativno stabilne. Večinoma imajo v okolju na voljo tudi kisik, ki deluje kot akceptor elektronov v zadnji fazi oksidacije substrata (Rodríguez Couto in Toca-Herrera, 2006). To daje prednost lakazam pred peroksidazami, ki so lahko bolj učinkovite, vendar je potrebno dodajati peroksid, ki je toksičen.

### **2.5.1 Struktura in delovanje lakaz**

Lakaze (benzendiol:kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) spadajo v skupino oksidaz in jih najdemo v vseh domenah življenja (Hoegger in sod., 2006). Imajo nizko substratno specifičnost in lahko oksidirajo različne fenolne in nefenolne spojine, med drugim tudi lignin, protimikrobne spojine in farmacevtike (Dwivedi in sod., 2011). Pri tem sklopijo oksidacijo substrata z redukcijo molekularnega kisika v vodo. Reakcijo katalizirajo štirje bakrovi atomi, ki se nahajajo v reakcijskem centru encima znotraj štirih, s histidinom bogatih, regij (Nakamura in sod., 2003; Morozova in sod., 2007; Dwivedi in sod., 2011). Aminokislinsko zaporedje teh regij je ohranjeno pri različnih organizmih in zato se ti deli genskega zaporedja lahko uporabijo kot vezavna mesta za začetne oligonukleotide za pomnoževanje lakaznih genov s PCR (Ausec in sod., 2011a; Ausec in sod., 2011b).

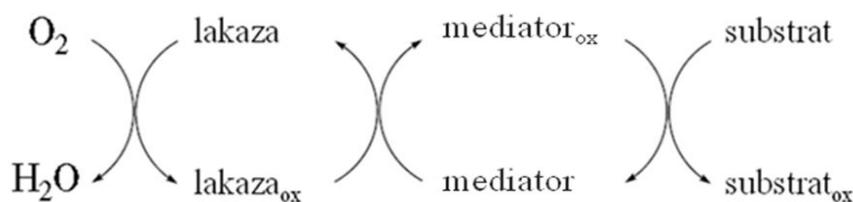
Lakaze so dimerni ali tetramerni (gliko)proteini. Vsak monomer vsebuje štiri bakrove atome, ki so organizirani v tri domene: tip 1 (T1), tip 2 (T2) in tip 3 (T3). Glede na strukturo in lastnosti bakrovih centrov se lakaze delijo na lakaze z nizkim redoks potencialom in na lakaze z visokim redoks potencialom. Predvsem je pomemben redoks potencial domene T1, saj lahko lakaze direktno oksidirajo samo tiste snovi, katerih redoks potencial ne presega redoks potenciala bakrovega iona v domeni T1 (povzeto po Morozova in sod., 2007; Dwivedi in sod., 2011).

Katalitična funkcija tri-domenskih lakaz je odvisna od štirih bakrovih atomov, razporejenih v treh centrih, in poteka v treh glavnih korakih (Dwivedi in sod., 2011):

1. Redukcija bakrovega iona v T1 z odvzemom elektronov iz substrata.
2. Prenos elektronov na bakrove ione v T2 in T3.
3. Predaja elektronov iz bakrovih ionov T2 in T3 na kisik, ki se reducira v vodo.

Razlika redoks potencialov med substratom, ki bo oksidiran, in bakrovim ionom v T1 je glavna gonilna sila reakcije. Z odkritjem soli 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS), ki lahko deluje kot specifični substrat za lakazo in poveča delovanje encima, se je število spojin, ki jih lakaze lahko oksidirajo, dramatično povečalo. ABTS namreč deluje tudi kot prenosnik elektronov med lakazo in substratom, pri čemer nastanejo reaktivni radikali, ki sodelujejo bodisi pri polimerizaciji ali degradaciji substrata. Pri tem najprej lakaza oksidira ABTS, ki se nato reducira v začetno obliko z oksidacijo substrata (Slika 2).

ABTS lahko neencimsko oksidira substrat z redoks potencialom, ki presega redoks potencial lakaze. Reduciran ABTS je rahlo zelene barve, medtem ko je oksidirana oblika ABTS temno zelena, kar se uporablja za dokazovanje lakazne aktivnosti. Poleg ABTS so opisali še več kot 100 mediatorjev, kot so 2,6-dimetoksifenol (DMP), 1-hidroksibenzotriazol (HBT), 1-hidroksiftamid (HPI) in vanilična kislina (VA). Te komponente imajo dovolj visoke redoks potenciale in lahko izvedejo več katalitičnih ciklov, pri tem pa se kemijsko ne spremenijo (povzeto po Morozova in sod., 2007; Dwivedi in sod., 2011).



**Slika 2:** Shematski prikaz katalitične funkcije lakaz v prisotnosti mediatorja (Morozova in sod., 2007).

Poleg tri-domenskih lakaz so nedavno odkrili tudi dvo-domenske lakaze (Nakamura in sod., 2003). Ti encimi so manjši kot običajne tri-domenske lakaze in v aktivni obliki zavzamejo homotrimetrično strukturo.

### 2.5.2 Vrste lakaz in njihova ekološka vloga

Proučevanje lakaz se je, za razliko od večine drugih encimov, začelo šele konec 19. stoletja. Prvo lakazo so odkrili leta 1883 pri japonskem drevesu *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883, cit. po Dwivedi in sod., 2011), kasneje so jih našli in opisali še pri drugih rastlinah (povzeto po Dwivedi in sod., 2011). Rastlinske lakaze so ekstracelularni encimi in sodelujejo pri sintezi lignina, celjenju ran in oksidaciji železa (povzeto po Morozova in sod., 2007; Dwivedi in sod., 2011).

Ekstracelularne lakaze so našli tudi pri glivah, in sicer jih proizvajajo askomicete, deuteromicete in bazidiomicete. Predvsem so pogoste pri glivah mehke in bele lesne trohnobe, saprofitnih in patogenih glivah. Sodelujejo pri razgradnji lignina, pigmentaciji, morfogenezi in patogenezi (povzeto po Morozova in sod., 2007; Dwivedi in sod., 2011).

Nedavne študije dokazujejo, da so lakaze prisotne tudi v prokariontih (Ausec in sod., 2011a; Ausec in sod., 2011b). Od glivnih in rastlinskih se razlikujejo po tem, da so

locirane intracelularno (Alexandre in Zhulin, 2000). Bakterijske lakaze sodelujejo pri tvorbi melanina, vpletene pa so tudi v sintezo proteinskega plašča endospor (povzeto po Dwivedi in sod., 2011).

### 2.5.3 Bakterijske lakaze

Leta 1993 so pri negibljivem melanogenem sevu proteobakterije *Azospirillum lipoferum* iz rizosfere riža poročali o prvi bakterijski lakazni aktivnosti (Givaudan in sod., 1993). Lakazno aktivnost so našli tudi pri heterocistični cianobakteriji *Anabaena azollae* (Malliga in sod., 1996). Termostabilno lakazo CotA, ki sodeluje pri sintezi melaninu podobnega pigmenta plašča endospore, so našli pri *Bacillus subtilis* (Martins in sod., 2002). CotA lakaza naj bi igrala pomembno vlogo pri zaščiti endopore pred UV-svetlobo in vodikovim peroksidom. Opisali so tudi lakaze pri *Streptomyces cyaneus* in *Streptomyces lavendulae* (Arias in sod., 2003; Suzuki in sod., 2003). Mnenje, da so morda lakaze razširjene po celotni domeni bakterij, sta okrepila Alexandre in Zhulin (2000), ki sta z algoritmom BLAST v različnih bakterijskih genomih našla prepričljive homologe glivnih lakaz in s tem spodbudila iskanje novih.

Poleg tri-domenskih lakaz, podobnih glivnim, so nedavno odkrili tudi dvo-domenske bakterijske lakaze (Nakamura in sod., 2003). Z uporabo Hidden Markov modelov (pHMM) so gene, ki kodirajo domnevne dvo-domenske lakaze, že našli pri *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* in *Firmicutes* ter znotraj razredov *Alpha*-, *Beta*- in *Gammaproteobacteria* (Ausec in sod., 2011b). Tri-domenske lakaze so pri bakterijah bolj pogoste kot dvo-domenske in tudi bolj raznolike. Našli so jih pri *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Nitrospira*, *Gemmatimonadetes* in *Firmicutes* (Ausec in sod., 2011b). Ausec in sodelavci (2011b) so ugotovili še, da se, glede na prisotnost signalnih peptidov, okoli 76% proučenih bakterijskih lakaz izloča iz citoplazme in niso locirane intracelularno, kot kažejo druge študije (Alexandre in Zhulin, 2000).

Bakterijske lakaze se od glivnih razlikujejo po tem, da imajo optimum za razgradnjo nekaterih substratov (npr. ABTS ali DMP) višji kot glivne in da so nekatere aktivne in stabilne tudi pri zelo visoki temperaturi (Dwivedi in sod., 2011). Vse to daje bakterijskim lakazam določeno prednost za uporabo v biotehnoloških procesih, kjer se za enkrat uporabljajo izključno glivne lakaze.

### 2.5.4 Razgradnja farmacevtikov z glivnimi lakazami

Za nekatere glivne lakaze so že dokazali, da razgrajujejo farmacevtske učinkovine. Ob prisotnosti glive *Phanerochaete chrysosporium* se je povečalo odstranjevanje antibiotikov oseltamivir, eritromicin, sulfametoksazol in ciprofloksacin (Accinelli in sod., 2010). Komercialno lakazo, izolirano iz glive *Mycelioph thorathermophila*, so uporabili za odstranjevanje analgetikov (diklofenak in naproksen) ter estrogenih hormonov (Lloret in sod., 2010). Lakazo, izolirano iz glive bele lesne trohnobe *Trametes versicolor*, so uporabili za uspešno odstranjevanje analgetikov ibuprofena (Marco-Urrea in sod., 2009) in ketoprofena (Marco-Urrea in sod., 2010) ter antibiotika sulfametazina (García-Galán in sod., 2011).

## 2.6 BIORAZGRADNJA DIAZEPAMA V ODPADNIH VODAH

S pilotnimi študijami so dokazali, da pride pod vplivom lakazne aktivnosti glive *T. versicolor* do povečanja v učinkovitosti biorazgradnje DZ (26–43 %), in sicer je ta odstotek večji v primeru obdelave surovega aktivnega blata z inokulumom *T. versicolor* po čiščenju OV (Rodríguez-Rodríguez in sod., 2011 in 2012). Nedavno so z očiščeno lakazo, izolirano iz askomicete *Paraconiothyrium variabile*, dokazovali učinkovitost odstranjevanja benzodiazepinov, in sicer v odsotnosti oziroma prisotnosti encimskih mediatorjev. V odsotnosti lakaznih mediatorjev, se je začetna koncentracija DZ (10 µg/ml) zmanjšala za 18,6 %, dodatek mediatorja 1-hidroksibenzotriazol (HBT), ki se je izkazal za najbolj učinkovitega, pa je zmanjšal koncentracijo DZ za 61,4 % (Ostadhadi-Dehkordi in sod., 2012).

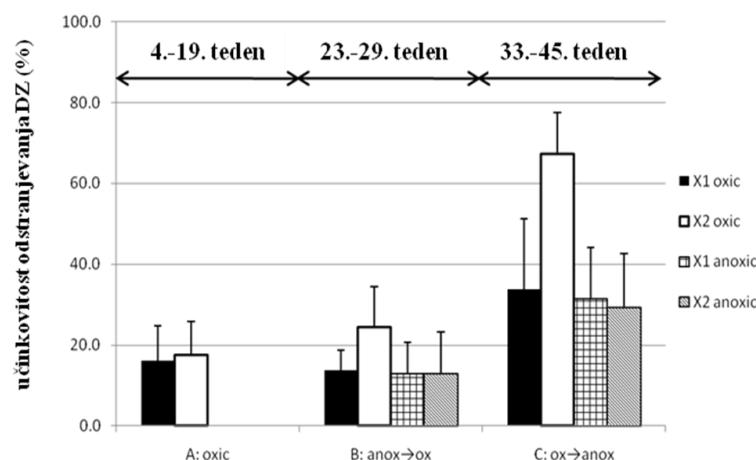
DZ velja za zelo obstojno farmacevtsko sredstvo, ki se lahko kopiči v sedimentih, je izredno stabilen v tleh, podzemnih vodah in med čiščenjem OV (Löffler in sod., 2005). Čeprav obstajajo individualne študije, ki kažejo na uspešno odstranjevanje DZ iz OV, je splošno pričakovana stopnja odstranjevanja nizka. Še najbolj učinkovita metoda za odstranjevanje DZ iz odplak bi bila fotokemična obdelava OV v kombinaciji z adsorpcijo na aktivno oglje, ki lahko zmanjša koncentracijo DZ tudi do 99% (Kosjek in sod., 2012; Verlicchi in sod., 2012). Vendar pa so takšni postopki obdelave nerealni in obsežni, zato bi bilo potrebno poiskati bolj izvedljive postopke za obdelavo OV. Ena izmed možnosti bi bila biološka razgradnja DZ v OV. Večina podatkov, ki se nanaša na učinkovitost čiščenja OV v čistilnih napravah, kaže, da je DZ dokaj slabo razgradljiv, tako v aerobnih kot v anaerobnih pogojih (Löffler in sod., 2005; Straub, 2008).

DZ je zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti precej topen v vodi, biorazgradnjo pa ovira prisotnost halogenske funkcionalne skupine, zato večinoma nespremenjen prehaja skozi čistilno napravo (Straub, 2008). Nizka vrednost koeficiente Kd (< 500 l/kg), ki kaže razmerje med porazdelitvijo diazepama v AB in OV, kaže da je DZ prisoten predvsem v

vodni fazni (Straub, 2008; Verlicchi in sod., 2012). Posledično se z adsorpcijo na AB odstrani le manjši delež DZ ( $< 2\%$ ) (Straub, 2008). Adsorpcijo DZ dodatno ovirajo kratki zadrževalni časi AB v čistilni napravi, zato adsorpcija ni pomemben način odstranjevanja DZ iz OV. Več kot 10 % DZ se odstrani z biorazgradnjo, ki pa je relativno počasen proces (Kümmerer, 2008; Straub, 2008). Za DZ, ki preide iz čistilne naprave v površinske vode, pričakujejo, da se relativno hitro razgradi s fotolizo. Preostali DZ pa se adsorbira na neraztopljeni trdno snovi, ki se poseda in tvori sedimente. Predvidevajo, da se na ta način DZ začasno odstrani iz kroženja v okolju (Straub, 2008).

Verlicchi in sodelavci (2012) so primerjali učinkovitost odstranjevanja DZ v čistilnih napravah z AB in z MBR. V neobdelani komunalni OV so zasledili DZ v koncentraciji 21–23 µg/l. Po sekundarni stopnji čiščenja z AB se je koncentracija DZ zmanjšala za 8,1 %, po čiščenju z MBR pa za 26,1 %. Večji odstotek v učinkovitosti odstranjevanja DZ v primeru MBR so pripisali dejству, da slednji vsebujejo večjo koncentracijo biomase, ki se tudi dlje časa zadržuje v bioreaktorju in je zato tudi bolj stabilna kot biomasa v čistilnih napravah z AB (Sipma in sod., 2010; Verlicchi in sod., 2012). Jelic in sodelavci (2011) so ugotovili, da se v sekundarni stopnji čiščenja 42–65 % začetne koncentracije DZ adsorbira na AB, preostali del (35–58 %) pa ostane v vodi in se izloči iz čistilne naprave. Procesa biorazgradnje DZ niso zaznali, kar bi lahko bila posledica kratkih zadrževalnih časov AB. Tudi rezultati drugih študij so pokazali, da je učinkovitost biorazgradnje DZ v MBR večja kot v primeru čiščenja z AB. V čistilnih napravah z AB pa naj bi prihajalo predvsem do adsorpcije DZ na biomaso (Jelic in sod., 2011).

Kosjek in sodelavci (2012) so preverjali uspešnost biorazgradnje DZ z AB v aerobnih in anaerobnih pretočnih pilotskih bioreaktorjih. Aerobna biorazgradnja se je izkazala za bolj učinkovito kot anaerobna, saj je po 45 tednih obratovanja v enem izmed aerobnih bioreaktorjev prišlo do povečanja v učinkovitosti odstranjevanja DZ iz 18 % na 67 % (Slika 3).



**Slika 3:** Učinkovitost biorazgradnje diazepama po 45 tednih obratovanja bioreaktorjev (A: aerobno, B: anaerobno → aerobno, C: aerobno → anaerobno) (Kosjek in sod., 2012).

Predpostavili so, da je ta pojav posledica prilagoditve biomase testiranih bioreaktorjev. Ker ni bila objavljena še nobena študija o vplivu DZ na mikrobijsko združbo, smo v tej magistrski nalogi želeli to preveriti.

### **2.6.1 Karakteristike pilotne čistilne naprave za odstranjevanje diazepamov**

Kosjek in sodelavci (2012) so leta 2009 pričeli s proučevanjem učinkovitosti odstranjevanja DZ iz OV na pilotni čistilni napravi, ki simulira delovanje klasične komunalne čistilne naprave z AB. Učinkovitost odstranjevanja DZ so ugotavljali na osnovi razlik med koncentracijami DZ na vtoku in iztoku pilotne čistilne naprave ter s spremeljanjem nastanka razgradnih produktov DZ.

Pilotna čistilna naprava je bila sestavljena iz treh paralelnih bioreaktorjev. V aerobna pretočna bioreaktorja (X1 in X2) z volumnom 4 litre so kontinuirano dodajali sintetično OV z DZ v koncentraciji 100 µg/l, in sicer 2 litra na dan z zadrževalnim časom 48 ur. V 15 mesecev trajajočem poskusu so spremljali učinkovitost odstranjevanja DZ z AB. Za kontrolo so uporabili bioreaktor brez dodatka DZ (R0). Za zagon bioreaktorjev so uporabili AB bioreaktorjev, ki so bili predhodno izpostavljeni farmakološkim učinkovinam. Bioreaktorji so obratovali 66 tednov, razmere se v tem času niso spreminjaile, kar je omogočilo adaptacijo biomase na fizikalno-kemijske parametre, prikazane v Preglednici 2.

**Preglednica 2:** Fizikalno-kemijski parametri v bioreaktorjih (Kosjek in sod., 2012).

Parameter	Vrednost
Temperatura, T (°C)	22 ± 1
Koncentracija kisika, c(O <sub>2</sub> ) (mg/l)	6,5 ± 1,5
Koncentracija sušine v aeracijskem tanku, MLSS (g/l)	2,3 ± 0,5

Koncentracijo DZ so merili s plinsko kromatografijo z masno spektrometrično detekcijo (GC-MS), učinkovitost odstranjevanja DZ pa so določili z razliko v koncentraciji DZ na vtoku in iztoku bioreaktorjev. Hkrati so s tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UPLC) sledili še razgradne produkte DZ, tj. oksazepam, nordazepam in temazepam, ki so hkrati tudi produkt metabolizma v jetrih in se prodajajo kot samostojni farmacevtiki.

Delovanje bioreaktorjev so ocenjevali z merjenjem skupne kemijske potrebe po kisiku (KPK) ter z merjenjem vsebnosti nitratnega (NO<sub>3</sub>-N), nitritnega (NO<sub>2</sub>-N) in amonijskega (NH<sub>4</sub>-N) dušika. Tekom obratovanja so se vrednosti KPK v bioreaktorjih zmanjšale za približno 95 % (Preglednica 2). Povprečna vrednost KPK na iztoku je bila 10 mg/l, kar ne

presega zakonsko določenih mejnih vrednosti KPK za OV (125 mg/l; Uredba o emisiji snovi pri odvajjanju odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav, 2007). Povečanje koncentracije  $\text{NO}_3\text{-N}$  in zmanjšanje koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  v iztoku je potrdilo, da je tekel v bioreaktorjih proces nitrifikacije. Količina  $\text{NH}_4\text{-N}$  v iztoku je bila za več kot 50 % manjša kot v dotoku in se je tekom obratovanja zmanjšala na 13 mg/l, kar presega zakonsko določeno mejno vrednost  $\text{NH}_4\text{-N}$  v OV (10 mg/l; Uredba o emisiji snovi pri odvajjanju odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav, 2007), zato bi bila potrebna dodatna odstranitev  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Rezultati so pokazali, da so stabilne aerobne razmere omogočile oksidacijo ogljikovih organskih spojin (redukcija KPK) in oksidacijo dušikovih organskih spojin (nitrifikacija).

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili materiale, navedene v Preglednicah 3-5.

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema in pripomočki

**Preglednica 3:** Uporabljena laboratorijska oprema.

Oprema	Model	Proizvajalec
Avtoklav	A-21	Kambič, Slovenija
Aparat za PCR	Biometra TProfessional Standard	Biometra, Nemčija
Brezprašna komora	AHC-2D	ESCO, ZDA
Centrifuga	5424	Eppendorf, Nemčija
Hladilnik	New Line	Gorenje, Slovenija
Instrument za elektroforezo	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, ZDA
Instrument za DGGE	Bio-Rad Protean II	Bio-Rad, ZDA
Magnetno mešalo	Rotamix 550MMH	Tehnica, Slovenija
Napajalnik za elektroforezo	Biometra Standard Power Pack P25	Biometra, Nemčija
Stresalnik	Vibromix 40	Tehnica, Slovenija
Tehnica	AY612	Sartorius, Nemčija
Termoblok	Stuart SBH 130DC	Golias Labortehnika, Slovenija
UV-transiluminator	G:BOX	Syngene, Velika Britanija
	DBT-08	Uvitec, Velika Britanija
UV-VIS spektrofotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific, ZDA
Vibracijski stresalnik	Vibromix 10	Tehnica, Slovenija
Vodna kopel	SW22	Julabo, Nemčija
Zamrzovalnik (-80°C)	HERAFreeze HFU B	Thermo Electron Corporation, ZDA

**Preglednica 4:** Uporabljeni laboratorijski pripomočki.

Pripomoček	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
Cepilne zanke	Sarstedt, Nemčija
Erlenmajerice	Simax, Češka
Glavniki za elektrofofezo	Bio-Rad, ZDA
Glavniki za DGGE	Bio-Rad, ZDA
Merilni valji	Kartell, Italija
Mikrocentrifugirke	Brand, Nemčija
Mikrotitrskie plošče	Brand, Nemčija
Multikanalna pipeta	Brand, Nemčija
Nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija
Parafilm	Fisher Scientific, ZDA
Pipete	Brand, Nemčija
Sterilne plastične petrijevke	Golias Labortechnika, Slovenija
Sterilne igle	BD, ZDA
Sterilni skalpeli	Medicon, Nemčija

### 3.1.2 Reagenti in drobna oprema

**Preglednica 5:** Uporabljeni reagenti.

Reagent	Založna koncentracija
Agaroza	/
Akrilamid	40 %
Ampicilin	1 g/ml
APS	10 %
BSA	10 mg/ml
DNA nanašalni pufer	6 x
DNA lestvica: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, ZDA)	0,1 µg/µl
DNA polimeraza: <i>Taq</i> DNA Polymerase (Promega, ZDA), Kapa2G Fast DNA Polymerase (KapaBiosystems, ZDA)	5 u/µl
Etanol	70 %, 96 %
Etidijev bromid	10 mg/l
Formamid	100 %
Glicerol	80 %
IPTG	100 mM
Mešanica dNTPs	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
Pufer za PCR	5 x
Sybr Safe	10 000 x
TEMED	99 %
Urea	/
Voda: destilirana (dH <sub>2</sub> O), MiliQ (MQ)	/
X-gal	50 mg/ml

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili sledeče komercialno dostopne komplete:

- Komplet za izolacijo celokupne DNA (PowerSoil® DNA Isolation Kit; MoBio, ZDA)
- Komplet za čiščenje produktov PCR (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, ZDA)
- Komplet za kloniranje produktov PCR (pGEM-T Easy Vector Systems; Promega, ZDA)

### **3.1.3 Pufri in raztopine**

#### Tris-acetatni pufer za elektroforezo (TAE)

Za pripravo 50 x TAE smo uporabili:

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

#### Denaturacijska raztopina za DGGE

Za pripravo 0 % založne denaturacijske raztopine smo uporabili:

Akrilamid (40 %)	18,75 ml
TAE (50x)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

Za pripravo 80 % založne denaturacijske raztopine smo uporabili:

Akrilamid (40 %)	18,75 ml
TAE (50x)	1 ml
Urea	33,6 g
Formamid	32 ml
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

### 3.1.4 Gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili trdno in tekočo obliko gojišča LB (Luria Bertani) za selekcijo med transformiranimi in netransformiranimi celicami. Vsa gojišča smo pred uporabo avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo gojiščem dodali antibiotik ampicilin (Amp) v končni koncentraciji 100 µg/ml ter po potrebi še izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG) v končni koncentraciji 0,5 mM in X-gal v končni koncentraciji 80 µg/ml.

Sestava tekočega gojišča LB:

tripton	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

Pri transformaciji kompetentnih celic smo uporabili tekoče gojišče SOB (Super Optimal Broth) z dodano glukozo (SOC).

Sestava gojišča SOC:

tripton	2 g
kvasni ekstrakt	0,5 g
NaCl (1 M)	1 ml
KCl (1 M)	0,25 ml
Mg <sup>2+</sup> (2 M)	1 ml
glukoza (2 M)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	do 100 ml

### 3.1.5 Bakterijski sevi

Za transformacijo in pripravo genskih knjižnic smo uporabili komercialno pripravljene kompetentne celice *E. coli* seva DH5α in JM109 (Preglednica 6), ki omogočata učinkovito transformacijo in večji donos plazmidov kot drugi sevi *E. coli*.

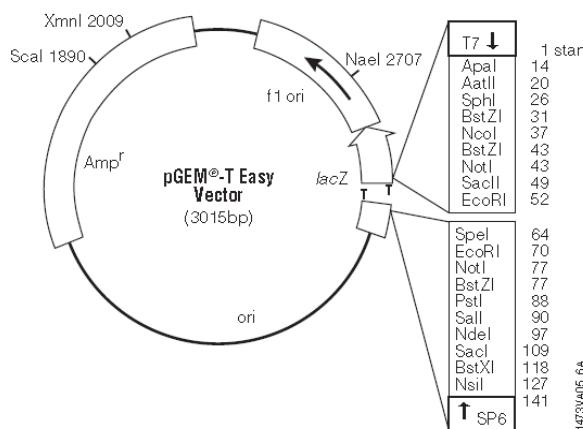
**Preglednica 6:** Genotip sevov DH5 $\alpha$  in JM109 bakterije *E. coli*.

Sev <i>E.coli</i>	Genotip
DH5 $\alpha$	F $^-$ , endA1, glnV44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r $_K^-$ m $_K^+$ ), $\lambda$ -
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r $_K^-$ , m $_K^+$ ), relA1, supE44, $\Delta$ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqI $^q$ Z $\Delta$ M15]

### 3.1.6 Plazmid pGEM®-T Easy

Za kloniranje produktov PCR smo uporabili plazmid pGEM®-T Easy (Promega, ZDA) (Slika 4).

Lineariziran vektor pGEM®-T Easy ima na 3' koncu vezan timidin, ki preprečuje recirkularizacijo, kar ojača učinkovitost vnosa produkta PCR v plazmid ob ligaciji. Plazmid je v celici prisoten v velikem številu kopij. Znotraj zaporedja, ki kodira  $\alpha$ -peptidno regijo encima  $\beta$ -galaktozidaze, ima plazmid pGEM®-T Easy vstavljeno poliklonsko mesto, kar omogoča t.i. modro-belo selekcijo. Ob vstavitvi produkta PCR na to mesto, se tvori neaktivna  $\beta$ -galaktozidaza, ki ne more cepiti substrata X-gal. Te celice tvorijo bele kolonije. V kolikor do ligacije produkta PCR ne pride, pa se tvori aktivna  $\beta$ -galaktozidaza, ki cepi  $\beta$ -glikozidno vez v analogu laktoze X-gal. Slednji razpade na D-galaktozo in 5-bromo-4-kloroindoksil, ki neencimatsko dimerizira in oksidira v barvni produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo. Posledično tvorijo te celice modre kolonije. Poliklonsko mesto je obdano z T7 in SP6 promotorjem RNA-polimeraze, kar omogoča ugotavljanje nukleotidnega zaporedja vključenega produkta PCR z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma T7 in SP6 (povzeto po Promega Corporation, 2010).



**Slika 4:** Shema plazmida pGEM®-T Easy (Promega Corporation, 2010).

### 3.1.7 Začetni oligonukleotidi

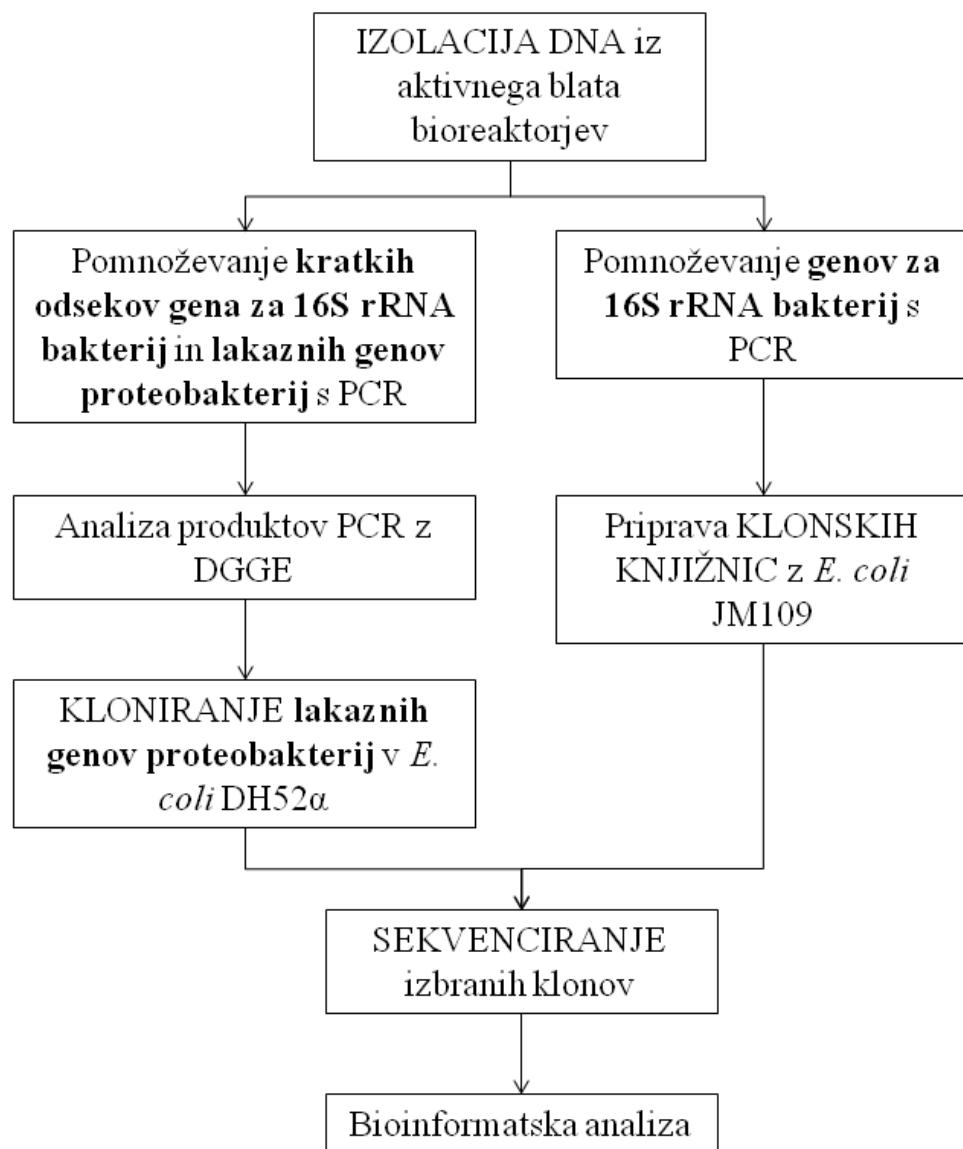
Za pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA, bakterijskih lakaznih genov in lakaznih genov proteobakterij smo uporabili začetne oligonukleotide, prikazane v Preglednici 7.

**Preglednica 7:** Uporabljeni začetni oligonukleotidi.

Gen, ki kodira	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→ 3')	Referenca
16S rRNA	27f	AGAGTTGATCCTGGCTCAG	Edwards in sod., 1989
	1401r	CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG	Lane in sod., 1985
16S rRNA (V3 regija)	357F	[CGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCG GGGCACGGGGGG]CCTACGGGAGGCAG CAG	Muyzer in sod., 1993
	517R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer in sod., 1993
Bakterijske lakaze	Cu1AF	ACMWCBGTYCAYTGGCAYGG	Kellner in sod., 2008
	Cu4R	TGCTCVAGBAKRTGGCAGTG	Ausec in sod., 2011a
Lakaze proteobakterij	Cu1AF-GC	[CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCG GGGCACGGGGGG]ACMWCBGTYCAYT GGCAYGG	Katedra za mikrobiologijo, Biotehniška fakulteta
	Cu2R	GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC	Kellner in sod., 2008
Gen, vključen v plazmid pGEM®-T Easy	T7	TAATACGACTCACTATAAGGG	Promega Corporation, 2010
	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	

## 3.2 METODE

V okviru magistrske naloge smo preučevali strukturo in filogenetsko sestavo bakterijske združbe in zastopanost genov domnevnih proteobakterijskih lakaz v treh bioreaktorjih (X1, X2, R0) kot je prikazano na Sliki 5.



**Slika 5:** Hodogram eksperimenta.

### 3.2.1 Pilotna čistilna naprava: vzorčenje in kemijska analiza

Za spremeljanje učinkovitosti odstranjevanja DZ so Kosjek in sodelavci (2012) oblikovali aerobna pretočna bioreaktorja (X1 in X2), kamor so kontinuirano dodajali umetno OV z dodatkom DZ (100 µg/l). Za kontrolo jim je služil bioreaktor brez dodatka DZ (R0). Delovanje bioreaktorjev, ki so obratovali 66 tednov, so ocenjevali s spremeljanjem fizikalno-kemijskih parametrov (Preglednica 2) in s spremeljanjem razgradnih produktov DZ.

Učinkovitost odstranjevanja DZ so določili z razliko v koncentraciji DZ na vtoku in iztoku bioreaktorjev. Vzorce so najprej filtrirali, da so odstranili suspendirane snovi, nato pa jih

skoncentrirali s trdno – fazno ekstrakcijo (SPE), da so dobili čiste ekstrakte, primerne za nadaljnjo analizo s plinsko kromatografijo z masno spektrometrično detekcijo (GC-MS). SPE omogoča predpripravo vzorca, da izoliramo in koncentriramo analit iz matriksa (vode) v organsko topilo, primerno za analizo z GC-MS (Kosjek in sod., 2005). GC-MS omogoča kvalitativno in kvantitativno ločevanje molekul v vzorcu, ki zaradi razlik v afiniteti do stacionarne faze različno hitro potujejo po kromatografski koloni, masni spektrometer pa določi njihovo strukturo in molekulske maso (McMaster, 2008).

Kosjek in sodelavci (2012) so ugotovili, da pride do signifikantnega povečanja v učinkovitosti odstranjevanja DZ šele po 65. tednu obratovanja bioreaktorjev (Preglednica 8).

**Preglednica 8:** Učinkovitost odstranjevanja diazepama (DZ) v aerobnih bioreaktorjih (X1, X2) tekom enoletnega obratovanja.

Časovna točka	Datum vzorčenja	Učinkovitost odstranjevanja diazepama (%)	
		X1	X2
w0 (začetni teden, pred dodatkom DZ)	15.12.2009	/	/
w14 (14. teden po dodatku DZ)	23.3.2010	16	18
w65 (65. teden po dodatku DZ)	17.3.2011	16	63
w66 (66. teden po dodatku DZ)	24.3.2011	25	71

Na Katedri za mikrobiologijo je bilo opravljeno vzorčenje AB vseh treh bioreaktorjev v štirih časovnih točkah: pred dodatkom DZ (w0), po 14. tednih obratovanja (w14) ter v 65. in 66. tednu obratovanja (w65 in w66) bioreaktorjev. Vzorci so bili do nadalnjih analiz hranjeni pri - 80°C.

### 3.2.2 Molekularno biološke metode

#### 3.2.2.1 Izolacija DNA iz aktivnega blata bioreaktorjev

Pri izolaciji DNA iz AB bioreaktorjev smo uporabili PowerSoil® DNA izolacijski kit (MoBio, ZDA) in pri postopku izolacije sledili navodilom proizvajalca (MoBio Laboratories Inc., 2010). Naredili smo 2 neodvisni izolaciji DNA (a,b) za vsako časovno točko (w0, w14, w65, w66) za vsak bioreaktor (X1, X2, R0).

Izolirano kromosomske DNA smo nanesli na 0,8 % agarozni gel in jo primerjali z DNA standardno lestvico Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, ZDA), da bi ocenili

njeno velikost. Elektroforeza je tekla 30 minut pri napetosti 90 V. Sledilo je barvanje gela v raztopini etidijevega bromida ( $0,5 \mu\text{g/l}$ ), razbarvanje gela v  $\text{dH}_2\text{O}$  in slikanje gela z UV-transiluminatorjem. Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, ZDA).

### 3.2.2.2 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA v verižni reakciji s polimerazo

#### Pomnoževanje kratkih odsekov gena za 16S rRNA za analizo sestave združbe z DGGE

V3 regijo gena za 16S rRNA smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo (PCR), za katero smo uporabili začetna oligonukleotida 357F in 517R (Preglednica 7), kot matrico pa izolirano DNA.

Reakcijska mešanica ( $25 \mu\text{l}$ ) je vsebovala  $0,5 \mu\text{M}$  vsakega začetnega oligonukleotida,  $200 \mu\text{M}$  mešanice dNTP-jev, 1 % deioniziranega formamida,  $2 \text{ mM MgCl}_2$ , 1 x reakcijski pufer,  $0,025 \text{ u}/\mu\text{l Taq DNA-polimeraze}$  (Promega, ZDA) in  $1\mu\text{l}$  DNA matrice. Uporabili smo pogoje PCR opisane v študiji Muyzer in sod. (1993): začetni denaturaciji pri  $94^\circ\text{C}$  (5 min) je sledilo 30 ciklov pomnoževanja in nato podaljšana polimerizacija pri  $72^\circ\text{C}$  (5 min). Cikli pomnoževanja so bili sestavljeni iz denaturacije pri  $94^\circ\text{C}$  (30 s), naleganja začetnih oligonukleotidov pri  $65 - 55^\circ\text{C}$  (30 s) (v vsakem drugem ciklu pomnoževanja se je temperatura zmanjšala za  $1^\circ\text{C}$ , dokler ni dosegla temperature naleganja začetnih oligonukleotidov, t.j.  $55^\circ\text{C}$ , pri kateri je sledilo še 10 dodatnih ciklov) in polimerizacije pri  $72^\circ\text{C}$  (1 min).

Pri pomnoževanju V3 regije gena za 16S rRNA smo pričakovali produkte velikosti okoli 200 bp.

#### Pomnoževanje gena za 16S rRNA za pripravo genskih knjižnic

Iz obeh neodvisnih izolacij DNA (a,b) bioreaktorjev X1 in X2 v časovni točki w66 (X1A, X1B, X2A, X2B) smo s PCR pomnožili bakterijske gene za 16S rRNA.

Uporabili smo začetna oligonukleotida 27f in 1401r (Preglednica 7). Naredili smo 3 reakcijske mešanice PCR po  $25 \mu\text{l}$  za vsako izolacijo. Vsaka reakcijska mešanica je vsebovala  $0,5 \mu\text{M}$  vsakega začetnega oligonukleotida,  $200 \mu\text{M}$  mešanice dNTP-jev,  $1,5 \text{ mM MgCl}_2$ , 1 x reakcijski pufer,  $0,025 \text{ u}/\mu\text{l Taq DNA-polimeraze}$  (Promega, ZDA) in  $1 \mu\text{l}$  DNA matrice. PCR je potekala pod sledečimi pogoji: 5 minutna začetna denaturacija pri  $94^\circ\text{C}$ , 30 ciklov pomnoževanja (denaturacija pri  $94^\circ\text{C}$  1 minuto, naleganje začetnih oligonukleotidov pri  $54^\circ\text{C}$  1 minuto, podaljševanje pri  $72^\circ\text{C}$  1 minuto in 30 sekund) ter 10 minutna končna sinteza pri  $72^\circ\text{C}$ .

Pri pomnoževanju smo pričakovali produkte velikosti okoli 1400 bp.

### 3.2.2.3 Pomnoževanje bakterijskih lakaznih genov in lakaznih genov proteobakterij v verižni reakciji s polimerazo

#### Pomnoževanje dolgih odsekov bakterijskih lakaznih genov

Bakterijske lakazne gene smo pomnožili s PCR, v kateri smo uporabili začetna oligonukleotida Cu1AF in Cu4R (Preglednica 7), ki pomnožita regijo *cbr1–cbr4*, ter izolirano DNA kot matrico po protokolu opisanem v Preglednici 9.

Reakcijska mešanica (25 µl) je vsebovala 1 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 200 µM mešanice dNTP-jev, 0,8 mg/mL BSA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x reakcijski pufer, 0,025 u/µl *Taq* DNA-polimeraze (Promega, ZDA) in 1 µl DNA matrice.

Pri pomnoževanju bakterijskih lakaznih genov smo pričakovali produkte PCR velikosti od 600 do 1200 bp.

**Preglednica 9:** Osnovni PCR protokoli.

<b>Protokol</b>		<b>Bakterijski lakazni geni</b>	<b>Lakazni geni proteobakterij</b>
<b>1</b>	<b>Začetna denaturacija</b>	94 °C, 3 min	94 °C, 3 min
<b>2</b>	<b>Denaturacija</b>	94 °C, 30 s	94 °C, 1 min
<b>3</b>	<b>Prileganje začetnih oligonukleotidov</b>	48 °C, 30 s	53 °C, 1 min
<b>4</b>	<b>Polimerizacija</b>	72 °C, 1 min 30 s	72 °C, 30 s
<b>5</b>	<b>Podaljšana polimerizacija</b>	72 °C, 5 min	72 °C, 10 min
<b>Število ciklov pomnoževanja</b> (koraki 2–4)		30	20

#### Pomnoževanje lakaznih genov proteobakterij

Proteobakterijske lakazne gene smo pomnožili s PCR, kjer smo uporabili začetna oligonukleotida Cu1AF-GC in Cu2R (Preglednica 7), ki pomnožita regijo *cbr1–cbr2*, kot DNA matrico pa produkt PCR, dobljen s PCR za pomnoževanje genov za bakterijske lakaze.

Reakcijska mešanica ( $25 \mu\text{L}$ ) je vsebovala  $0,5 \mu\text{M}$  vsakega začetnega oligonukleotida,  $200 \mu\text{M}$  mešanice dNTP-jev, 1 % deioniziranega formamida,  $3 \text{ mM MgCl}_2$ , 1 x reakcijski pufer,  $0,025 \text{ u}/\mu\text{l Taq DNA-polimeraze}$  (Promega, ZDA) in  $1 \mu\text{L}$  DNA matrice. PCR je potekala po protokolu opisanem v Preglednici 9.

Pri pomnoževanju lakaznih genov proteobakterij smo pričakovali produkte velikosti okoli 200 bp.

### 3.2.2.4 Izvedba agarozne gelske elektroforeze

Velikost produktov PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili s segrevanjem ustrezne količine agaroze v 1 x pufri TAE. Uporabljali smo 0,8 % in 1,6 % agarozne gele. Polimerizacija gelov je potekala pri sobni temperaturi.

V jamice gela smo nanesli 5 enot vzorca DNA in 1 enoto nanašalnega pufra. Elektroforeza je tekla v 1 x pufri TAE pri napetosti 85–90 V, 30–40 minut. Po končani elektroforezi smo gele barvali v raztopini etidijevega bromida ( $0,5 \mu\text{g/l}$ ), nato pa razbarvali v  $\text{dH}_2\text{O}$ . Gele smo pregledali in slikali z UV-transiluminatorjem.

### 3.2.2.5 Analiza produktov PCR z elektroforezo v gradientu denaturanta

Kratke odseke genov za 16S rRNA in lakazne gene proteobakterij smo analizirali z elektroforezo v gradientu denaturanta (DGGE), ki temelji na razporejanju enako dolgih molekul v poliakrilamidnem gelu z vključenim denaturantom (urea in formamid) glede na vsebnost GC bp.

Za DGGE analize smo v PCR uporabili začetna oligonukleotida 357F (za 16S rDNA) in Cu1AF-GC (za lakazne gene proteobakterij) z dodanim 40 nukleotidov dolgim zaporedjem GC na 5' koncu (Preglednica 7).

Za 16S rDNA smo uporabili gradient denaturantov 30–55%, za lakazne gene proteobakterij pa 50–75%. Elektroforeza je tekla pri napetosti 60 V in temperaturi  $60^\circ\text{C}$  15 ur. Nato smo gel pobarvali z barvilm Sybr Safe in ga slikali z UV-transiluminatorjem.

### 3.2.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja genov za lakaze proteobakterij

#### Osamitev produktov PCR iz poliakrilamidnega gela

Izrazite (močnejše) lise na poliakrilamidnih gelih z gradientom, ki so vključevale fragmente lakaznih genov proteobakterij smo izrezali s sterilnim skalpelom. DNA smo sprostili iz gela z elucijo in očistili z dodatkom 20 µl vode MQ, vorteksiranjem in centrifugiranjem na sobni temperaturi (1 minuto pri 13.000 rpm) ter shranili čez noč v hladilniku. Naslednji dan smo ponovili korak centrifugiranja in supernatant uporabili v nadaljnjih analizah.

DNA, ki smo jo tako sprostili iz gela, smo uporabili za matrico v PCR, ki je potekala pod enakimi pogoji kot je opisano v Preglednici 9, le z manj cikli pomnoževanja (15) in PCR reakciji smo dodali 0,5 µl tako pridobljene DNA.

Uspešnost pomnoževanja s PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

Vzorce PCR smo nato ponovno nanesli tudi na poliakrilamidni gel z gradientom denaturantov 50–75 %, da bi preverili položaj pomnoženih fragmentov DNA, ki naj bi bil enak kot pred izrezovanjem izbranih lis. V primeru, da smo pridobili pričakovani rezultat, smo te fragmente nato klonirali v plazmid pGEM®-T Easy in jim določili nukleotidno zaporedje po postopku opisanem spodaj.

#### Kloniranje DNA fragmentov v plazmid pGEM®-T Easy in transformacija kompetentnih celic *E.coli* DH5α

Izbrane produkte PCR (1, 2, 3, 4, 5) smo vstavili v vektor pGEM®-T Easy (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca (Promega Corporation, 2010) ter z njim transformirali kompetentne celice *E. coli* DH5α. V 5 µl ligacijske mešanice smo dodali 100 µl kompetentnih celic. Sledila je 20 minutna inkubacija na ledu. Nato smo transformacijsko mešanico izpostavili toplotnemu šoku za 2 minuti pri 42 °C ter jo nato hladili 2 minuti na ledu. Transformacijski mešanici smo dodali 1 ml termostatiranega (37 °C) gojišča SOC ter jo inkubirali 1 uro pri 37 °C s stresanjem pri 200 rpm. Po inkubaciji smo transformacijsko mešanico centrifugirali (5 minut pri 8.000 rpm) na sobni temperaturi. S pipeto smo odstranili 900 µL supernatanta in celice resuspendirali v preostanku supernatanta. Transformacijsko mešanico smo v celoti nacepili na gojišče LB Amp IPTG X-gal in inkubirali 18 ur pri 37°C do izrasta posameznih kolonij.

### Preverjanje uspešnosti kloniranja

Uspešnost kloniranja smo preverili s PCR. Iz belih kolonij smo po toplotni lizi celic pomnožili DNA z uporabo vektorskih začetnih oligonukleotidov SP6 in T7 (Preglednica 7), ki dajo po PCR reakciji približno 300 bp velik produkt. Reakcijska mešanica (12 µl) je vsebovala: 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 200 µM mešanico dNTP-jev, 1 x pufer Kapa, 0,02 u/µL Kapa DNA-polimeraze (KapaBiosystems, ZDA) in košček kolonije. PCR reakcija je potekala sledeče: 3 minutna začetna denaturacija pri 95°C, 36 ciklov pomnoževanja (denaturacija pri 95°C 15 sekund, naleganje začetnih oligonukleotidov pri 55°C 15 sekund, podaljševanje pri 72°C 15 sekund) in 3 minutna končna sinteza pri 72°C.

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### Selekcija in sekvenciranje pozitivnih klonov

Kolonije, ki so dale pozitivno PCR reakcijo za prisotnost kloniranih fragmentov DNA, smo precepili na sveže LB plošče z ampicilinom. Kloniranim fragmentom DNA so nukleotidno zaporedje določili v Macrogen Europe (Nizozemska).

#### 3.2.2.7 Priprava knjižnic gena za 16S rRNA

### Osamitev produktov PCR iz agarognega gela

Produkte PCR smo s pomočjo skalpela izrezali iz agarognega gela in jih očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, ZDA) po navodilih proizvajalca (QIAGEN, 2008).

### Ligacija očiščenih produktov PCR v plazmid pGEM®-T Easy in transformacija kompetentnih celic *E.coli* JM109

Očiščene produkte PCR smo vstavili v plazmid pGEM®-T Easy (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca (Promega Corporation, 2010). Nato smo z vektorjem transformirali kompetentne celice *E.coli* JM109 (Promega, ZDA), ki smo jih nasadili na plošče z dodatkom Amp, IPTG in X-gal. Sledila je inkubacija pri 37°C preko noči.

### Preverjanje uspešnosti kloniranja

Bele kolonije smo preiskali za vključke pričakovane velikosti (okoli 1400 bp) z uporabo vektorskih začetnih oligonukleotidov SP6 in T7 (Preglednica 7). Reakcijska mešanica za PCR (12 µl) je vsebovala: 0,5 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 200 µM mešanice dNTP-jev, 1 x pufer Kapa, 0,02 u/µl Kapa DNA-polimeraze (KapaBiosystems, ZDA) in košček kolonije. PCR je potekala sledeče: 3 minutni začetni denaturaciji pri 94 °C je sledilo 25 ciklov pomnoževanja (denaturacija pri 94 °C 30 sekund, naleganje začetnih oligonukleotidov pri 53 °C 30 sekund, podaljševanje pri 72 °C 1 minuto) in 5 minutna končna sinteza pri 72 °C.

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### Selekcija in sekvenciranje pozitivnih klonov

Iz vsake genske knjižnice smo izbrali 96 klonov, ki smo jih prepikirali v mikrotitrsko ploščo s tekočim LB Amp. Po 6 urni inkubaciji pri 37 °C smo zrasle klone prenesli z multikanalno pipeto na sveže mikrotitrsko ploščo s trdnim LB Amp in jih inkubirali pri 37 °C preko noči. Naslednji dan smo preverili rast in plošče s kloni poslali sekvencirat (Macrogen Europe, Nizozemska).

## **3.2.3 Bioinformacijske metode**

### 3.2.3.1 Analiza profilov DGGE

Dobljene slike poliakrilamidnih gelov smo obdelali s programom BioNumerics, verzije 7.0 (Applied Maths NV, 2012) in izrisali dendrograme podobnosti profilov DGGE. Pri tem smo uporabili koeficient podobnosti Jaccard in metodo UPGMA (ang. unweighted pair-group method with arithmetic means, slov. neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino).

### 3.2.3.2 Analiza nukleotidnih zaporedij

Pridobljene kromatograme sekvenc smo ročno pregledali in po potrebi popravili z uporabo programa CodonCode Aligner, verzije 4.0.4 (CodonCode, 2013). Himerne sekvence smo poiskali s pomočjo programa UCHIME (Edgar in sod., 2011) in izključili iz nadaljnje analize. Za začetno filogenetsko razporeditev smo sekvence primerjali z razpoložljivimi sekvencami v bazi podatkov GenBank z uporabo orodja BLAST (NCBI, 2013).

Filogenetsko analizo sekvenc genov za 16S rRNA smo naredili s programom ARB (Ludwig in sod., 2004), s pomočjo katerega smo izrisali filogenetsko drevo po metodi največjega verjetja (ang. maximum-likelihood) in kriteriju varčnosti (ang. parsimony).

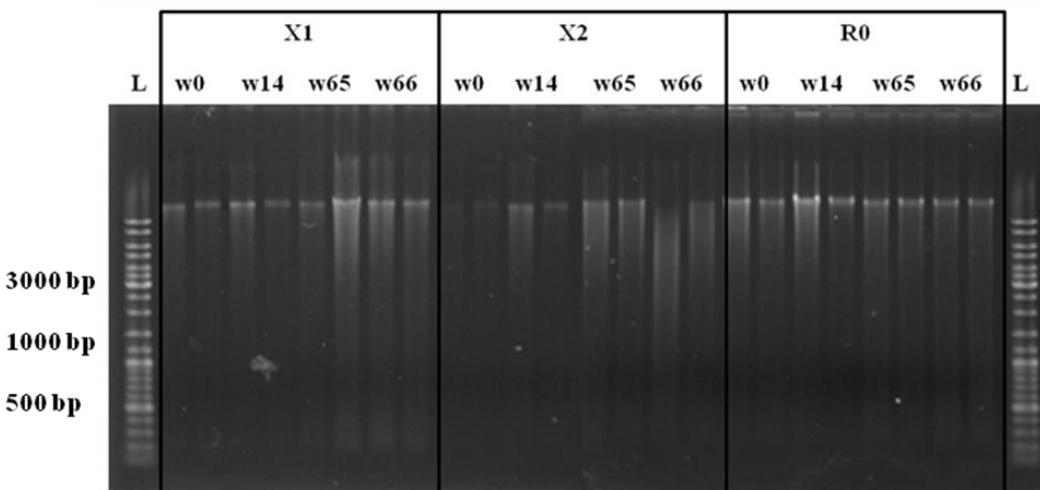
Sekvence genov za 16S rRNA smo vključili tudi v statistično analizo s programom Mothur (Schloss in sod., 2009). Zaporedja smo uvrstili v operativne taksonomske enote (OTE) in izrisali Vennov diagram porazdelitve OTE po knjižnicah. Z nabiralčevim krivuljem pri upoštevanju 3, 5 in 20 % podobnosti smo ugotavljalci ali je vzorec 365 klonov iz knjižnic gena za 16S rRNA zajel mikrobno pestrost vzorca. Z izračunom indeksov vrstne bogatosti (indeks Chao) in raznolikosti (indeksa Shannon in Simpson) smo ugotavljalci mikrobno pestrost bioreaktorjev X1 in X2.

Velikost vzorca, s katerim bi zajeli mikrobno raznolikost proučevanih bioreaktorjev, smo ocenili s pomočjo programskega orodja OriginPro 8.5.1 z ekstrapolacijo po modelu Michaelis-Menten (Origin Lab Corp., Northampton, MA, ZDA).

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZOLACIJA DNA IZ AKTIVNEGA BLATA BIOREAKTORJEV

Celokupno DNA smo izolirali iz skupno 24 vzorcev, tj. po 2 ponovitvi (a, b) za vsako časovno točko (w0, w14, w65, w66) in vsak bioreaktor (X1, X2, R0). Uspešnost izolacije je prikazana na Sliki 6. Koncentracija izolirane DNA se je gibala med 3 in 26 ng/µl. Čistost smo ocenili s primerjavo razmerja med  $A_{260}$  in  $A_{280}$ . Ker se je le-to v povprečju gibalo med 1,8 in 2,0, smo ocenili, da je izolirana DNA dovolj čista za nadaljnje delo. Izolirano celokupno DNA smo uporabili kot matrico pri pomnoževanju genov za 16S rRNA in genov, ki kodirajo domnevne lakaze bakterij.



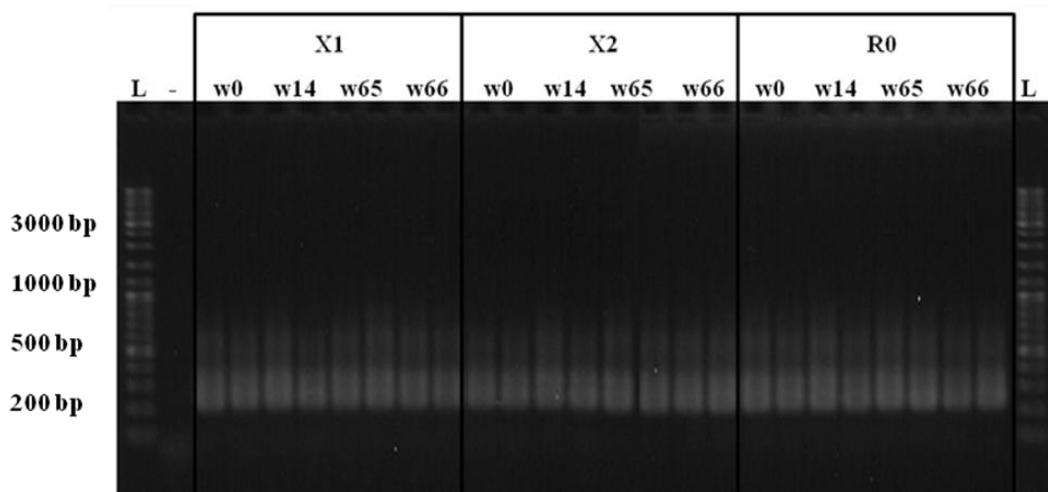
**Slika 6:** Vzorci izolirane celokupne DNA iz bioreaktorjev z dodatkom diazepamom (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66) (L = DNA lestvica).

### 4.2 VPLIV DIAZEPAMA NA STRUKTURO IN SESTAVO BAKTERIJSKE ZDRUŽBE

Vpliv DZ na strukturo bakterijske združbe smo preverjali v AB iz aerobnih bioreaktorjev, ki so bili 66 tednov izpostavljeni 100 µg/l DZ (X1 in X2) in jih primerjali z združbo v neizpostavljenem bioreaktorju (R0). V ta namen smo uporabili hitro metodo profiliranja združb DGGE, ki omogoča vpogled v raznolikost preučevanih mikrobnih združb na osnovi ločevanja produktov PCR glede na vsebnost GC bp.

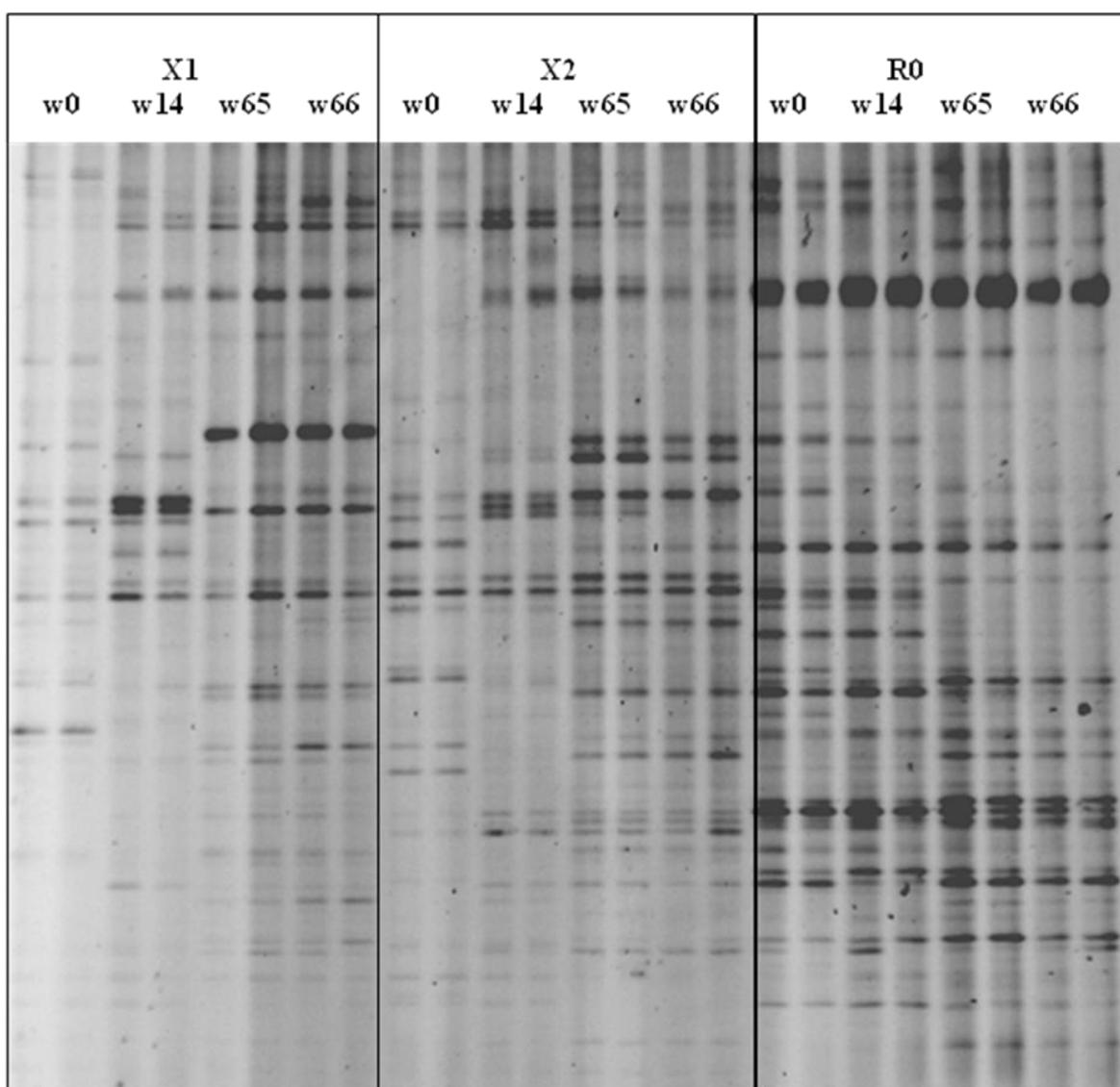
#### 4.2.1 Spremembe v strukturi bakterijske združbe bioreaktorjev med enoletnim obratovanjem

Za analizo z DGGE smo kot matrico uporabili iz AB bioreaktorjev izolirano DNA in s PCR pomnožili kratke odseke bakterijskih genov za 16S rRNA (200 bp, regija V3). Uspešnost pomnoževanja smo preverili na agaroznem gelu. Kot je prikazano na Sliki 7 smo uspeli pomnožiti tarčne gene, saj so v vseh vzorcih prisotni DNA fragmenti velikosti 200 bp.



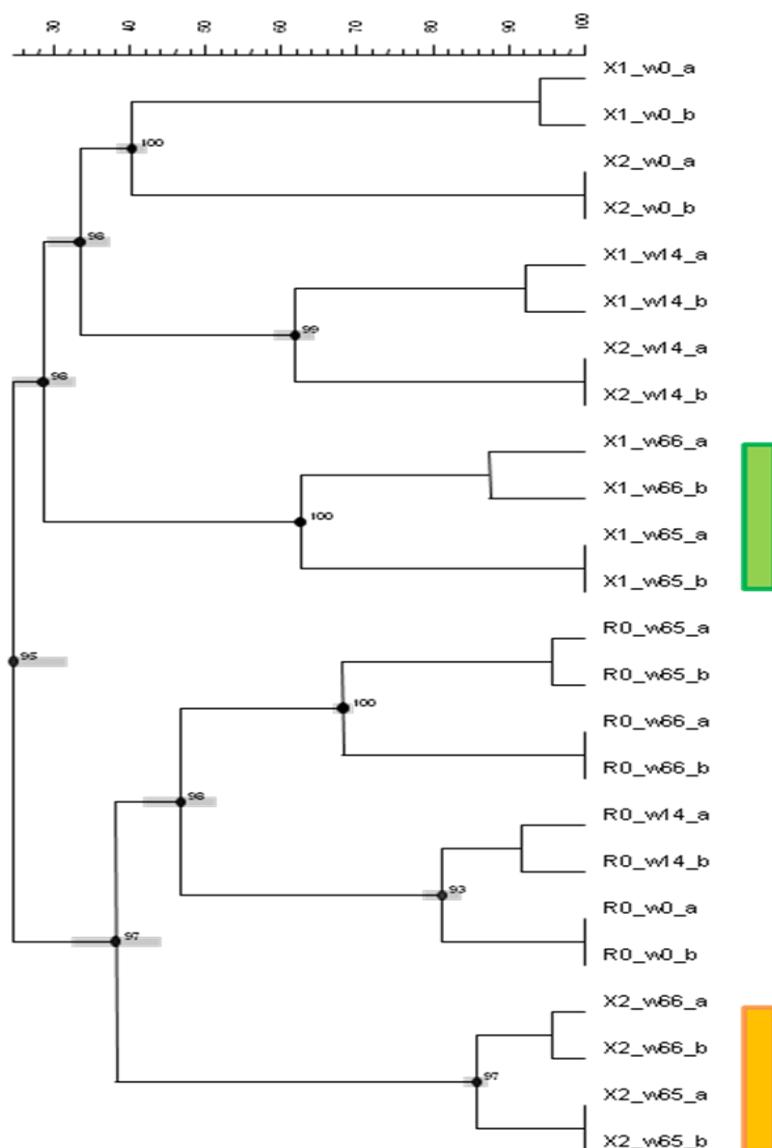
**Slika 7:** S PCR pomnožena V3 regija bakterijskih genov za 16S rRNA iz bioreaktorjev z dodatkom diazepamov (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66) (L = DNA lestvica, - = negativna kontrola).

Pomnoženo DNA smo nato preverili z DGGE in ugotovili, da se je bakterijska združba po času spreminja, pri čemer je bilo najmanj, že na oko vidnih, sprememb v kontrolnem bioreaktorju (R0), medtem ko se je struktura združbe v obeh bioreaktorjih, izpostavljenih DZ (X1 in X2), s časom opazno spremenila (Slika 8).



**Slika 8:** Profili DGGE delnih zaporedij gena za 16S rRNA bakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66).

Ta trend se je pokazal tudi z izrisom dendrograma po metodi UPGMA (Slika 9), saj so si bili profili DGGE kontrolnega bioreaktorja v časih w0 in w14 podobni v > 80 % ter v časih w65 in w66 še vedno v > 60 %, medtem ko so se profili DGGE bioreaktorjev X1 in X2 v končnem stanju (w65 in w66) med seboj zelo razlikovali (podobnost je bila < 30 %). Zanimivo je, da so v končni točki postali profili DGGE bioreaktorja X2 bolj podobni profilom DGGE kontrolnega bioreaktorja, kot so bili v začetku eksperimenta, medtem ko je podobnost bioreaktorja X1 s kontrolnim bioreaktorjem ostala zelo majhna (Slika 9). Profili DGGE v obeh ponovitvah (a, b) v vseh časovnih točkah so bili praktično enaki (90-100 % podobnost), kar kaže na dobro ponovljivost metode (Slika 9).



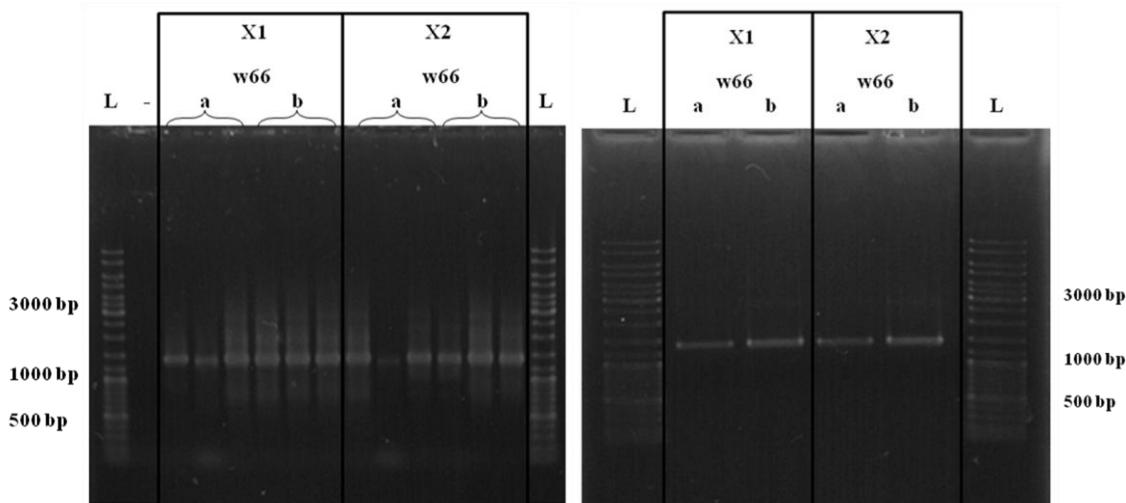
**Slika 9:** Primerjava profilov DGGE delnih zaporedij gena za 16S rRNA bakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0). Dendrogram smo izrisali z metodo UPGMA v programu BioNumerics. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66), črke zraven (a, b) pa označujejo ponovitev. Vrednosti na razvejiščih prikazujejo zanesljivost razvejitev v odstotkih. Oznake (■ in □) prikazujejo vzorce iz bioreaktorjev X1 in X2 odvzete ob koncu obratovanja.

Poleg tega smo preverili tudi število lis v profilih DGGE in ugotovili, da je bilo le to v kontrolnem bioreaktorju večje (28–31 lis v profilu), kot v bioreaktorjih X1 in X2 (18–21 lis v profilu) in da je število lis s časom naraščalo le v združbah bioreaktorjev X1 in X2 (Priloga A).

#### 4.2.2 Raznolikost bakterijske združbe bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja

Glede na rezultate analize profilov DGGE delnih zaporedij gena za 16S rRNA smo se odločili podrobneje proučiti sestavo in raznolikost mikrobne združbe bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja (w66). Poleg tega sta se oba bioreaktorja tudi signifikantno razlikovala v učinkovitosti odstranjevanja DZ, ki je bila 25 % v bioreaktorju X1 in 71 % v bioreaktorju X2. Kontrolnega bioreaktorja nismo zajeli v te analize, saj nas je predvsem zanimalo ali se bakterijske združbe v bremenjenih bioreaktorjih razlikujejo tudi na filogenetski ravni.

Da bi kar najbolje zajeli mikrobno raznolikost, smo izdelali štiri knjižnice genov za 16S rRNA in v vsaki analizirali po 96 klonov, in sicer po 2 knjižnici iz ponovitev (a, b) za vsak bioreaktor (X1A, X1B, X2A, X2B, Slika 10).



**Slika 10:** Delna zaporedja gena za 16S rRNA bakterij iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja (w66), ki smo jih uporabili v pripravi knjižnic genov, pred (levo) in po čiščenju (desno) (L = DNA lestvica, - = negativna kontrola).

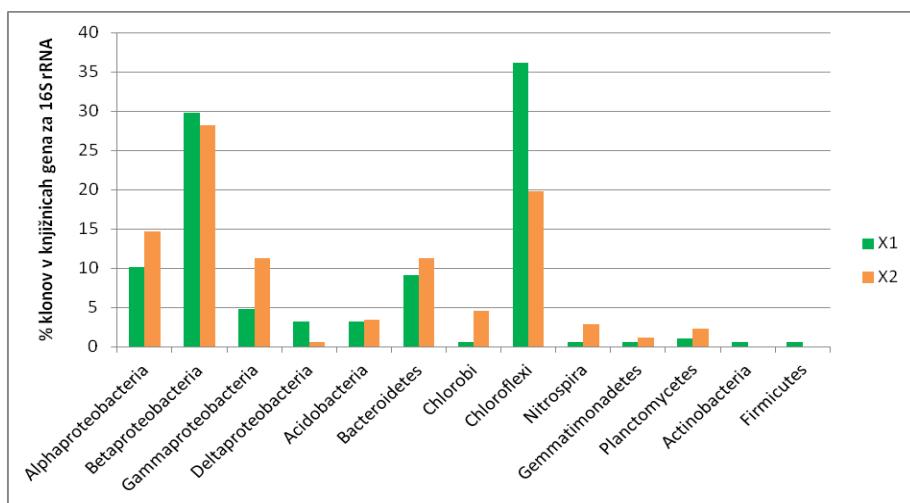
Po pregledu kromatogramov nukleotidnih zaporedij kloniranih genov za 16S rRNA smo dobili 365 sekvenč visoke kvalitete (93 za X1A, 95 za X1B, 91 za X2A in 86 za X2B), ki smo jih vključili v nadaljnjo analizo. Znotraj vzorca 365 delnih zaporedij gena za 16S rRNA smo prepoznali 169 operativnih taksonomskih enot (OTE, Preglednici 10 in 11).

Analiza klonskih knjižnic gena za 16S rRNA je pokazala visoko mikrobno raznolikost, saj smo lahko sekvenč uvrstili v 13 bakterijskih debel ( $\leq 20\%$  razlike v podobnosti zaporedij, Preglednica 10).

**Preglednica 10:** Porazdelitev sekvenc in operativnih taksonomskih enot (OTE) klonskih knjižnic (X1A, X1B, X2A, X2B) po filogenetskih skupinah. OTE predstavlja skupino sekvenc s 97 % podobnostjo.

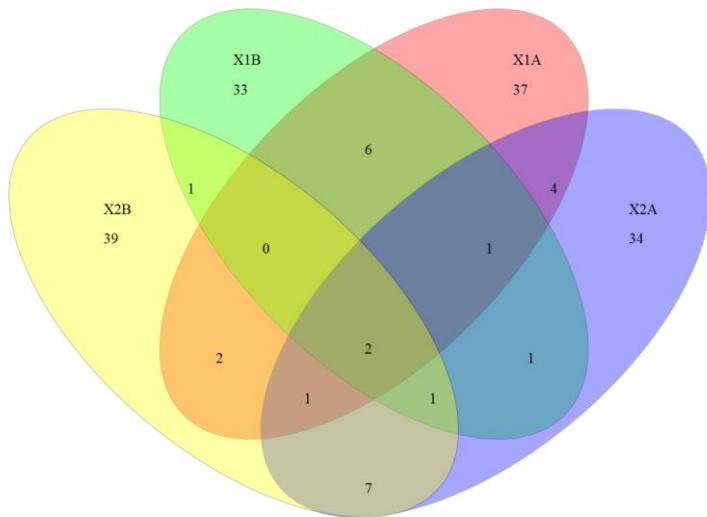
FILOGENETSKA SKUPINA	KNJIŽNICA							
	X1A		X1B		X2A		X2B	
	Kloni	OTE	Kloni	OTE	Kloni	OTE	Kloni	OTE
<i>Alphaproteobacteria</i>	7	4	12	5	19	15	7	7
<i>Betaproteobacteria</i>	31	24	25	18	30	13	20	19
<i>Gammaproteobacteria</i>	4	4	5	5	10	4	10	5
<i>Deltaproteobacteria</i>	5	5	1	1	1	1	0	0
<i>Acidobacteria</i>	2	1	4	2	3	3	3	2
<i>Bacteroidetes</i>	12	6	5	4	8	7	12	10
<i>Chlorobi</i>	1	1	0	0	6	2	2	2
<i>Chloroflexi</i>	27	4	41	8	8	3	27	3
<i>Nitrospira</i>	1	1	0	0	3	1	2	2
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	1	0	0	1	1	1	1
<i>Planctomycetes</i>	1	1	1	1	2	1	2	2
<i>Actinobacteria</i>	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Firmicutes</i>	0	0	1	1	0	0	0	0
<b>SKUPAJ</b>	<b>93</b>	<b>53</b>	<b>95</b>	<b>45</b>	<b>91</b>	<b>51</b>	<b>86</b>	<b>53</b>

V vzorcih AB bioreaktorjev X1 in X2 so bili daleč najbolj pogosti predstavniki debla *Proteobacteria* (predvsem razred *Betaproteobacteria*) in *Chloroflexi*. Po pogostosti pojavljanja so sledile sekvence, ki smo jih uvrstili v debla *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Chlorobi*, *Nitrospira*, *Planctomycetes* in *Gemmatimonadetes*. V debli *Actinobacteria* in *Firmicutes* sta se uvrstili samo sekvenci iz bioreaktorja X1. V bioreaktorju X1 so močno prevladovali predstavniki debla *Chloroflexi*, v bioreaktorju X2 pa so večino sekvenc predstavljal predstavniki iz razreda *Betaproteobacteria* (Slika 11).



**Slika 11:** Delež zaporedij gena za 16S rRNA, pridobljenih iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja, po bakterijskih deblih.

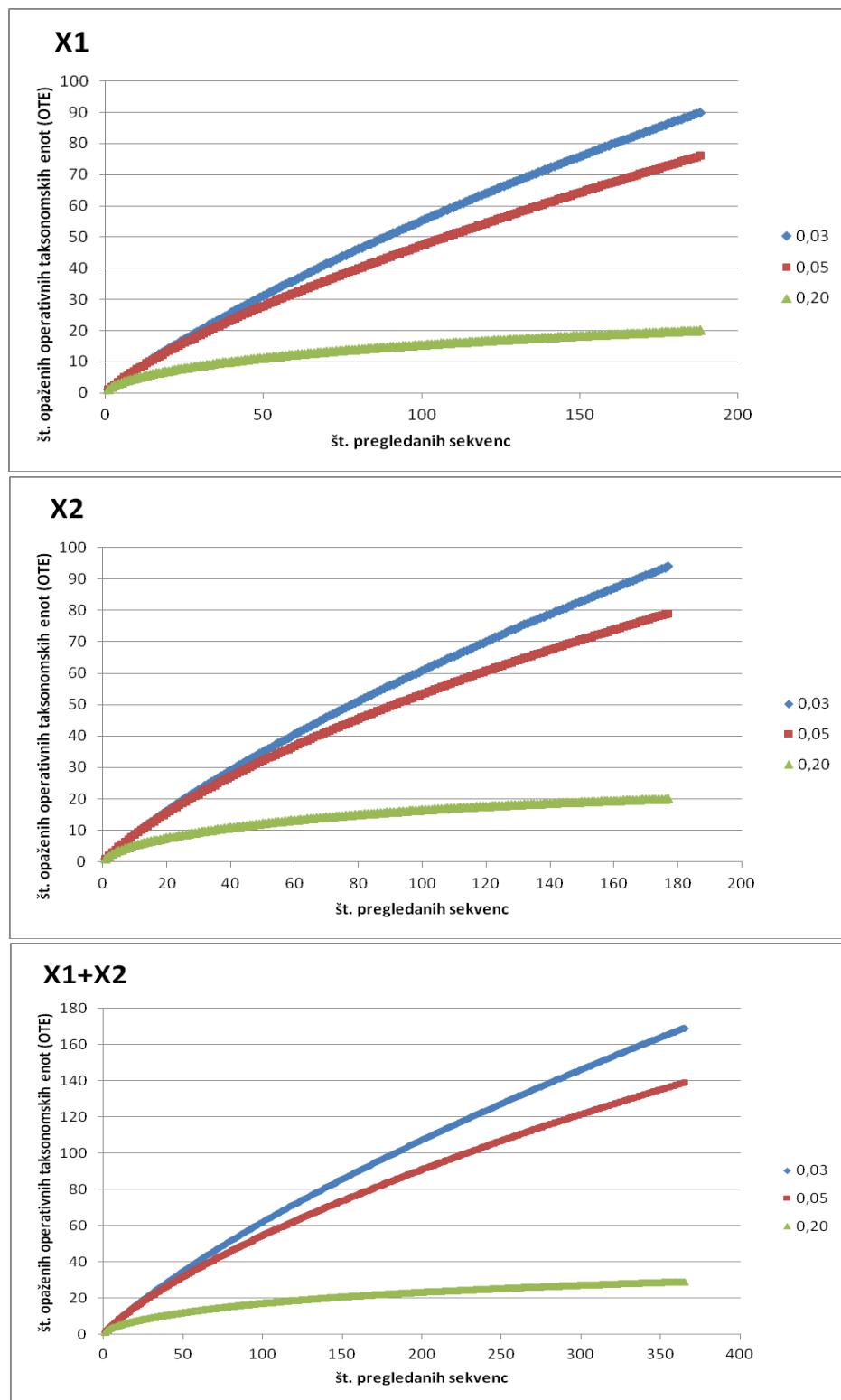
Ugotovili smo, da so si knjižnice med seboj različne po sestavi, skupni delež med knjižnicama X1A in X1B pa je večji kot z X2A in X2B ter obratno (Slika 12).



**Slika 12:** Vennov diagram, izrisan pri 3 % evolucijskih razdaljah, ki kaže razporeditev operativnih taksonomskih enot (OTE) po knjižnicah (X1A, X1B, X2A, X2B). Številke prikazujejo število OTE, ki so skupne knjižnicam.

Opazili smo, da je bila v obeh bioreaktorjih bakterijska združba zelo raznolika, saj nabiralčeve krivulje pri 3 % evolucijskih razdaljah (približek bakterijske vrste), 5 %

evolucijskih razdaljah (približek bakterijskega rodu) in 20 % evolucijskih razdaljah (približek bakterijskega debla) niso postale vzporedne z x osjo (Slika 13).



**Slika 13:** Nabiralčeve krivulje zaporedij gena za 16S rRNA iz genskih knjižnic bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja, izrisane pri 3 %, 5 % in 20 % evolucijskih razdaljah.

Tudi glede na ocenjeno število OTE v knjižnicah (indeks Chao, Preglednica 11) smo s knjižnicami uspeli zajeti le manjši del bakterijske pestrosti (13–40%). Vrednosti indeksa Shannon so prav tako pokazale visoko ( $> 3$ ) vrstno pestrost v vzorcih AB bioreaktorjev X1 in X2 (Preglednica 11).

**Preglednica 11:** Vrstna bogatost (indeks Chao) in raznolikost (indeksa Shannon in Simpson) gena za 16S rRNA v genskih knjižnicah (X1A, X1B, X2A, X2B) iz bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja pri 3 % evolucijskih razdaljah. Vrednosti v oklepajih sta spodnja in zgornja meja 95 % intervala zaupanja.

Ime knjižnice	Število OTE	Chao	Shannon	Simpson
X1A	53	140 (90 ; 258)	3,4 (3,2 ; 3,7)	0,07 (0,03 ; 0,11)
X1B	45	132 (81 ; 262)	3,1 (2,8 ; 3,5)	0,10 (0,05 ; 0,16)
X2A	51	130 (83 ; 245)	3,7 (3,5 ; 3,8)	0,02 (0,01 ; 0,03)
X2B	53	413 (183 ; 1054)	3,4 (3,1 ; 3,7)	0,08 (0,03 ; 0,13)

Izračuni indeksov Chao, Shannon in Simpson s pripadajočimi 95% intervali zaupanja pri 3 % evolucijskih razdaljah so pokazali, da med genskimi knjižnicami bakterijskih genov za 16S rRNA iz bioreaktorjev X1 in X2 ni razlik v bogatosti in pestrosti (Preglednica 11).

Da bi zajeli vrstno pestrost bioreaktorjev X1 in X2 ( $\leq 3$  % evolucijske razlike), bi morali pregledati vsaj 3000 sekvenc. S pregledom  $> 500$  sekvenc bi dobili okvirno pestrost za bioreaktor X1, z analizo  $> 700$  sekvenc pa bi dobili okvirno pestrost za bioreaktor X2.

#### 4.2.3 Sestava bakterijske združbe aktivnega blata bioreaktorjev X1 in X2 v zadnjem tednu obratovanja

Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA smo analizirali tudi v programu ARB, s pomočjo katerega smo izrisali filogenetsko drevo. Kot zunanjo skupino smo uporabili nukleotidna zaporedja izbranih arhejskih predstavnikov debla *Euryarchaeota* (Slika 14).

Največ sekvenc (30 %) se je uvrstilo v razred *Betaproteobacteria*. Predstavniki tega razreda so bili najbolj zastopana skupina v AB bioreaktorja X2 (30 %) in druga najbolj zastopana skupina v bioreaktorju X1 (30 %). Večina sekvenc se je uvrstila v družini *Comamonadaceae* (predvsem v rod *Sphaerotilus*) in *Rhodocyclaceae*. Osem sekvenc iz bioreaktorja X1 se je uvrstilo v vrsto *Sphaerotilus natans*. Predstavniki rodov *Delftia*, *Nitrosomonas* in *Methylophilus* so bili prisotni samo v knjižnicah iz bioreaktorja X1, v rod *Simplicispira* pa so se uvrstile samo sekvene iz bioreaktorja X2.

Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA so se uvrstila tudi v razrede *Alphaproteobacteria* (12 %), *Gammaproteobacteria* (6 %) in *Deltaproteobacteria* (2 %). Predstavniki razreda *Alphaproteobacteria* so bili tretja najbolj zastopana skupina v AB bioreaktorjev X1 (9 %) in X2 (14 %). Večino sekvenc iz bioreaktorjev smo lahko uvrstili v družino *Rhodobacteraceae* (predvsem v rod *Rhodobacter*). Ena sekvenca iz bioreaktorja X2 se je uvrstila v vrsto *Sphingosinicella xenopeptidilytica* znotraj družine *Sphingomonadaceae*. Predstavniki razreda *Gammaproteobacteria* so bili pogosteje zastopani v AB bioreaktorja X2, od katerih smo 1/3 sekvenc uvrstili v vrsto *Thiothrix eikelboom*. Predstavniki razreda *Deltaproteobacteria* so bili bolj pogosti v bioreaktorju X1, eno sekvenco smo lahko uvrstili v vrsto *Desulfomicrobium baculumatum*. Predstavnikov *Epsilonproteobacteria* v naših knjižnicah nismo zasledili.

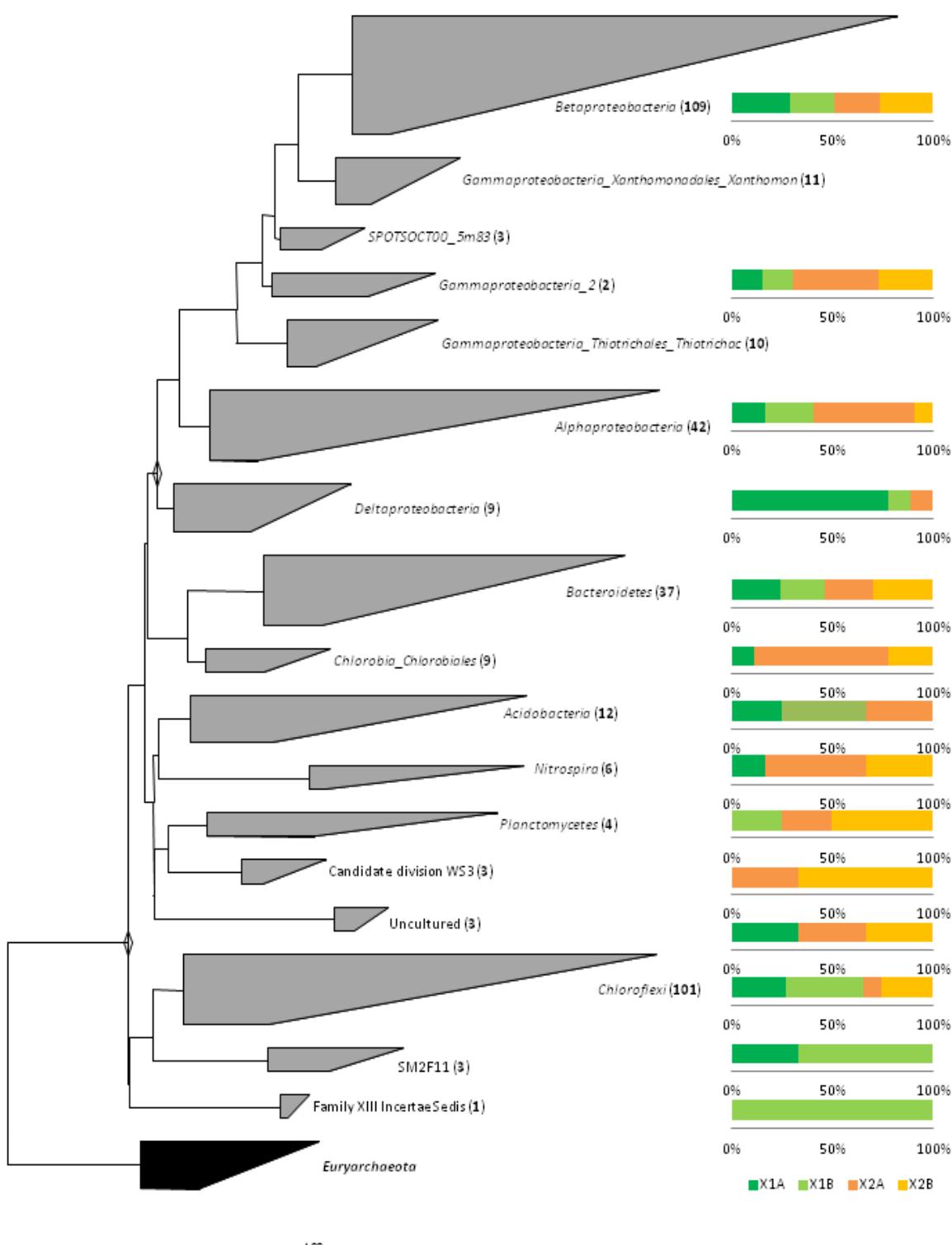
28 % sekvenc se je uvrstilo v deblo *Chloroflexi*. Predstavniki tega debla so bili najbolj zastopana skupina v AB bioreaktorja X1 (35 %) in druga najbolj zastopana skupina v bioreaktorju X2 (20 %). Tukaj rodov nismo mogli določiti, je pa večina zaporedij bila najbolj podobna zaporedjem, ki so jih opisali v AB iz komunalnih čistilnih naprav.

V deblo *Bacteroidetes* se je uvrstilo 10 % sekvenc. Nekatere sekvene iz bioreaktorja X2 so se uvrstile v rodoval *Lewinella* in *Ferruginibacter*. Ostale sekvene pa so vejile iz skupnega vozlišča kot samostojne linije in so bile najbolj podobne sekvencam opisanim v AB komunalnih čistilnih naprav.

V deblo *Acidobacteria* se je uvrstil manjši delež sekvenc (3 %), kjer rodov nismo mogli določiti. Zaporedja sekvenc so bila najbolj podobna sekvencam pridobljenim iz AB bioreaktorjev za čiščenje OV in sekvencam, ki so jih opisali v obdelovalnih tleh.

V deblih *Chlorobi*, *Nitrospira* in *Planctomycetes* so prevladovale sekvene iz bioreaktorja X2, vendar pa so predstavniki teh skupin predstavljeni manjši delež v knjižnicah iz bioreaktorja X2. Zaporedja sekvenc so bila najbolj podobna sekvencam, ki so jih opisali v AB bioreaktorjev za čiščenje OV.

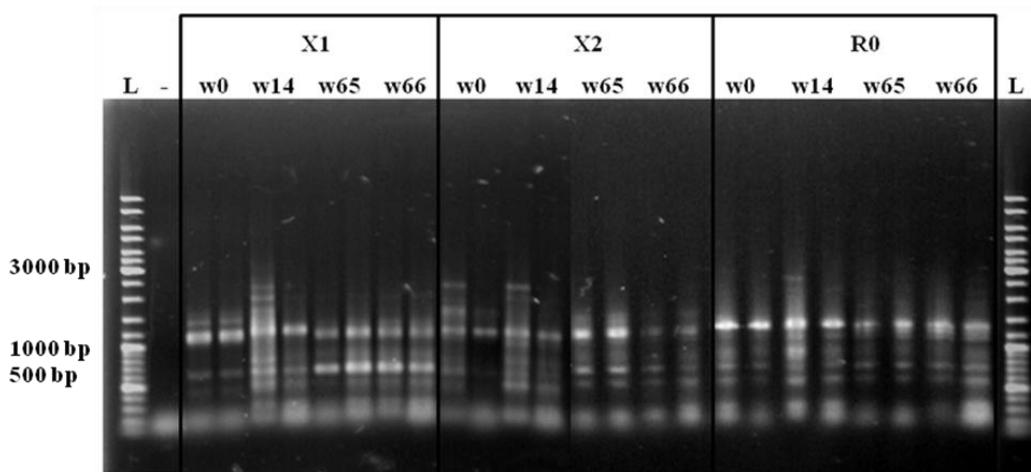
Nekaj sekvenc, pridobljenih iz bioreaktorjev X1 in X2, se je uvrstilo v debla, kjer najdemo samo sekvene, ne pa tudi gojene predstavnike (Candidate division WS3, Uncultured, SM2F11). Ena sekvenca iz bioreaktorja X1 je bila najbolj podobna sekvencam iz razreda *Clostridia*, ki se uvrščajo v družino Family XIII Incertae Sedis.



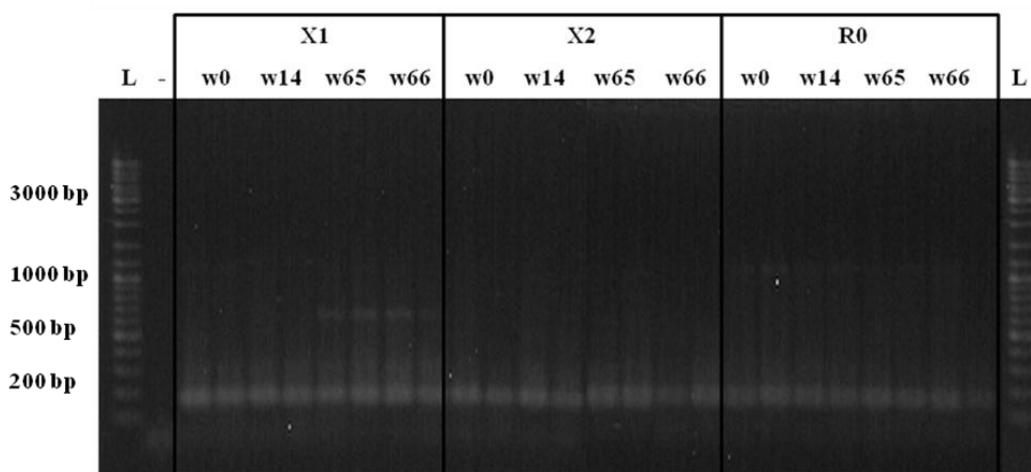
**Slika 14:** Filogenetsko drevo zaporedij gena za 16S rRNA bakterij, ki smo jih pridobili iz bioreaktorjev X1 (genski knjižnici X1A in X1B) in X2 (genski knjižnici X2A in X2B), izdelano z metodo največjega verjetja v programu ARB. V oklepajih je zapisano število sekvenč znotraj posamezne bakterijske skupine. Na desni so prikazani deleži zaporedij v filogenetskih skupinah po knjižnicah.

#### 4.3 VPLIV DIAZEPAMA NA RAZNOLIKOST GENOV ZA LAKAZE PROTEOBAKTERIJ

Za analizo z DGGE smo kot matrico uporabili s PCR pomnožene dolge odseke bakterijskih lakaznih genov (600 – 1200 bp, regija *cbr1–cbr4*) in s PCR pomnožili lakazne gene proteobakterij (200 bp, regija *cbr1–cbr2*). Uspešnost pomnoževanja smo preverili na agaroznem gelu (Sliki 15 in 16).

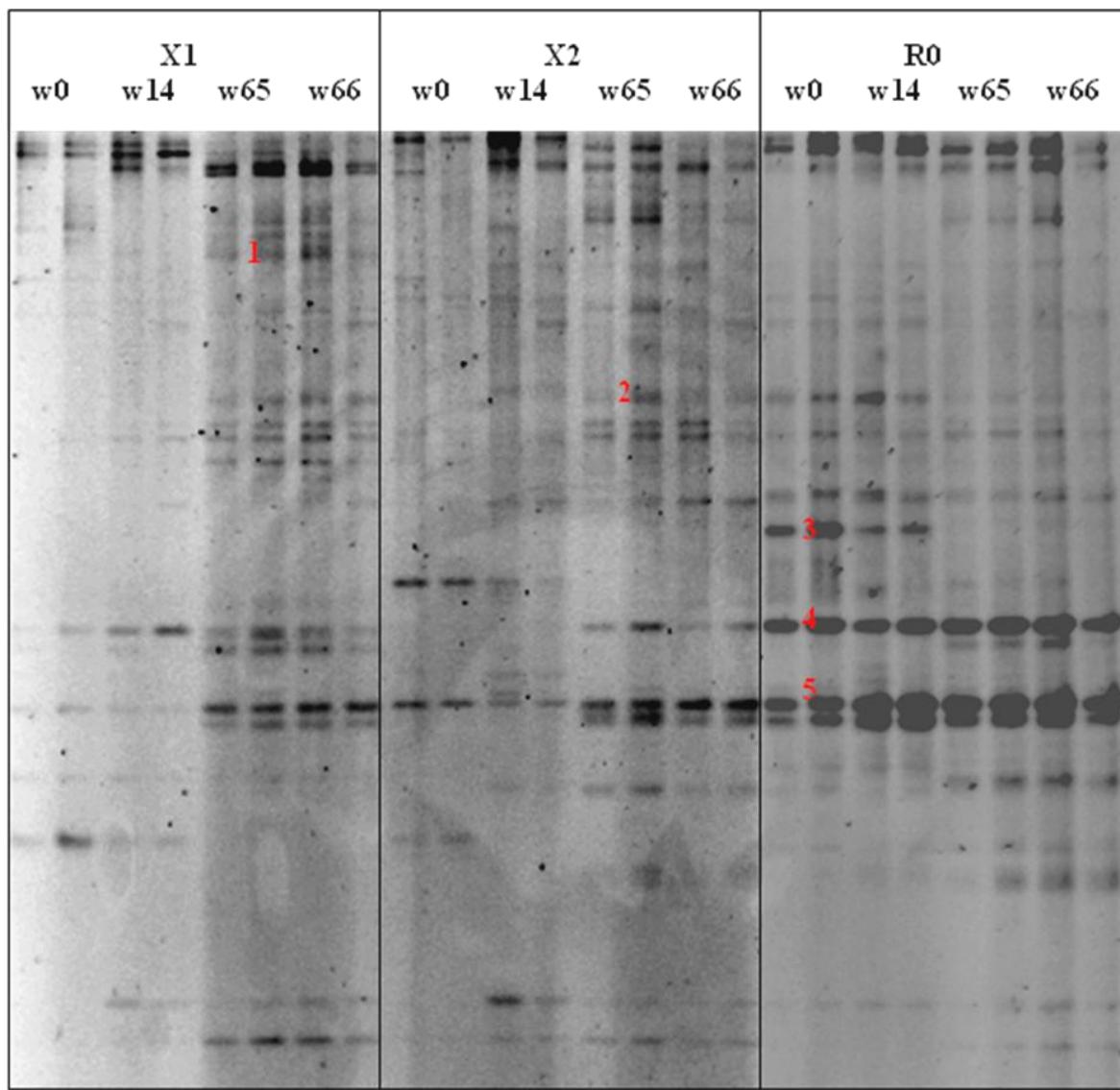


**Slika 15:** S PCR pomnoženi bakterijski lakazni geni iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66) (L = DNA lestvica, - = negativna kontrola).



**Slika 16:** S PCR pomnoženi lakazni geni proteobakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) ter kontrolnega bioreaktorja (R0) na agaroznem gelu. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66) (L = DNA lestvica, - = negativna kontrola).

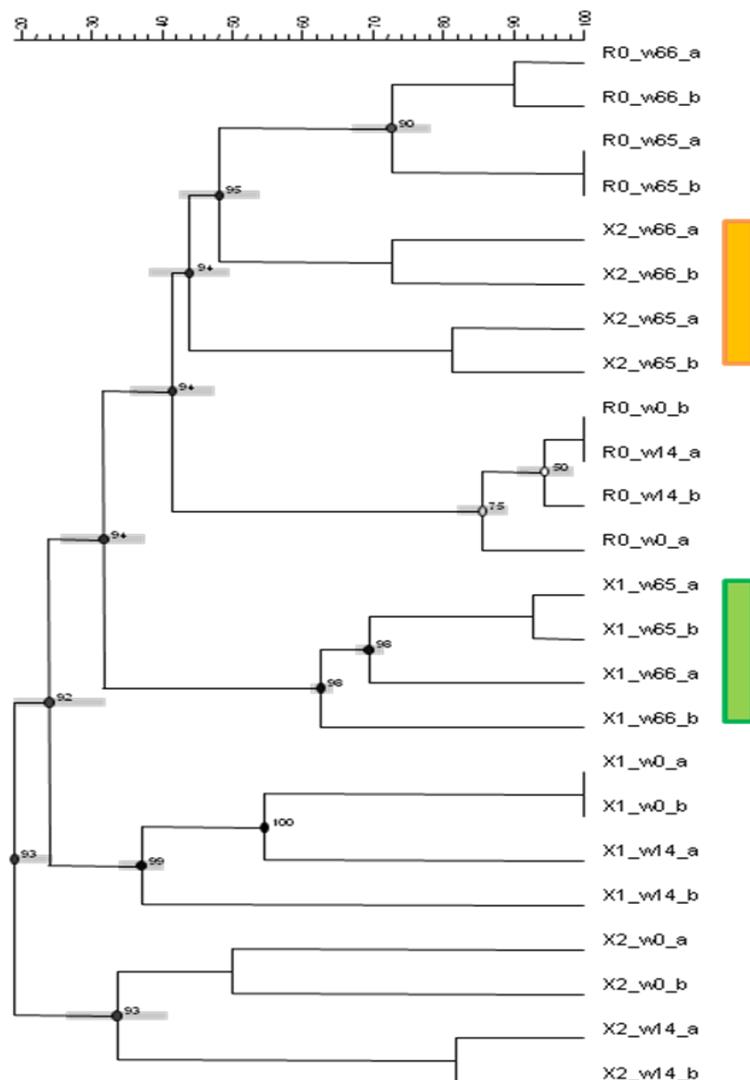
Pri analizi lakaznih genov proteobakterij z DGGE smo v vseh bioreaktorjih opazili podobnost med časovnima točkama w0 in w14 (začetno stanje) ter w65 in w66 (končno stanje). Kontrola (R0) je ostajala tekom obratovanja bolj ali manj nespremenjena, medtem ko so se profili bioreaktorjev X1 in X2 v končnem stanju spremenili v primerjavi z začetnim stanjem (Slika 17).



**Slika 17:** Profili DGGE delnih zaporedij gena za lakaze proteobakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66). Številke prikazujejo lise, katerim smo določili zaporedje.

Profili DGGE v obeh ponovitvah (a, b) po časovnih točkah v kontrolnem bioreaktorju so bili zelo podobni (80–100 % podobnost), medtem ko so bila v bioreaktorjih X1 in X2

nekoliko večja odstopanja v podobnosti profilov (50–100 % podobnost) (Slika 18). Profili začetnega stanja bioreaktorjev X1 in X2 so se močno razlikovali od profilov začetnega stanja kontrolnega bioreaktorja (20 % podobnost). V točkah w65 in w66 bi na osnovi dendrograma, izrisanega po metodi UPGMA, lahko sklepali, da je bioreaktor X2 postal nekoliko bolj podoben kontrolnemu bioreaktorju (48 % podobnost), medtem ko je bil bioreaktor X1 v končnih točkah kontrolnemu podoben le v 30 %. Vendar pa je bila podobnost proteobakterijskih lakaznih genov med kontrolnim in tretiranim bioreaktorjem večja na koncu, kot pa v začetku eksperimenta (Slika 18).



**Slika 18:** Primerjava profilov DGGE delnih lakaznih genov proteobakterij iz bioreaktorjev z dodatkom diazepama (X1, X2) in kontrolnega bioreaktorja (R0). Dendrogram smo izrisali z metodo UPGMA v programu BioNumerics. Številke vzorcev prikazujejo teden odvzema vzorca (w0, w14, w65, w66), črke zraven (a, b) pa označujejo ponovitev. Vrednosti na razvejiščih prikazujejo zanesljivost razvejitev v odstotkih. Oznake (■ in □) prikazujejo vzorce iz bioreaktorjev X1 in X2 odvzete ob koncu obratovanja.

Na osnovi števila lis v profilu DGGE bi lahko sklepali, da je bila raznolikost v začetnem stanju bioreaktorjev X1 in X2 najmanjša (7-13 lis v profilu), medtem ko je bila v končnem stanju bioreaktorjev X1 in X2 ter v profilih kontrolnega bioreaktorja raznolikost nekoliko večja (15-17 lis v profilu) (Priloga B), kar je podoben trend kot smo ga opazili pri 16S rRNA in kaže na to, da bioreaktorja X1 in X2 še nista bila v stacionarni fazi.

Lise s fragmenti potencialnih lakaznih genov proteobakterij, ki so se nam zdeli zanimivi, smo izrezali iz poliakrilamidnega gela in identificirali s pomočjo določanja nukleotidnih zaporedij (Slika 17, Preglednica 12).

**Preglednica 12:** Filogenetska umestitev lakaznim genom podobnih sekvenc, ki smo jih pridobili iz lis poliakrilamidnega gela (Slika 17), z uporabo algoritma BLAST. Deleži predstavljajo odstotek podobnosti.

Ime sekvence	Vir (bioreaktor, čas)	Najbližji sorodnik	%	Bakterijska skupina ali najbližji kultivabilni sorodnik	%
1	X1, w65	lakaza [nekultivabilna bakterija] (ADV52214.1)	53	domnevna oksidaza [ <i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535] (YP 005441380.1)	60
2	X2, w65	lakaza [nekultivabilna bakterija] (ADV52199.1)	79	domnevna oksidaza [ <i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1] (ZP 00964414.1)	81
3	R0, w0	domnevna lakaza [nekultivabilna bakterija] (ADH15936.1)	51	domnevna oksidaza [ <i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535] (YP 005441380.1)	58
4	R0, w0	domnevna lakaza [nekultivabilna bakterija] (ADH16079.1)	65	copA [ <i>Oceanibaculum indicum</i> P24] (ZP 11131381.1)	84
5	R0, w0	domnevna lakaza [nekultivabilna bakterija] (ADH15936.1)	56	domnevna oksidaza [ <i>Caldilinea aerophila</i> DSM 14535] (YP 005441380.1)	60

Ugotovili smo, da se v kontrolnem bioreaktorju močno obogati sekvenca 4, ki je šibko prisotna tudi v bioreaktorjih X1 in X2 (Slika 17). Zaporedje sekvence je bilo najbolj podobno tistim iz nekultivabilnih bakterij, katerih najbližji sorodnik je *Oceanibaculum indicum*, vrsta iz razreda *Alphaproteobacteria* (Preglednica 12).

V bioreaktorjih X1 in X2 je bila v 65. in 66. tednu obratovanja opazna obogatitev sekvence 2, ki je v istem časovnem obdobju v kontrolnem bioreaktorju izginila (Slika 17). Sekvenciranje je pokazalo, da gre za podobnost z genom za domnevno lakazo

nekutlivabilne bakterije, katere najbližji sorodnik je *Sulfitobacter* sp., ki se uvršča v razred *Alphaproteobacteria* (Preglednica 12).

Zaporedja sekvenc 1, 3 in 5 so bila slabše kvalitete, zato je tudi odstotek podobnosti pričakovano nizek (Preglednica 12). Zanimivo je, da je bil najbližji kultivabilni sorodnik vseh treh sekvenc *Caldilinea aerophila* iz debla *Chloroflexi*, čeprav smo za pomnoževanje uporabili začetne oligonukleotide specifične za lakazne gene proteobakterij.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Farmacevtiki so sintetične, biološko aktivne spojine, ki se v veliki meri in vedno bolj uporablajo v medicini in veterini (Fent in sod., 2006). Posledično se večajo njihove koncentracije v OV in čistilnih napravah (Farré in sod., 2001; Gómez in sod., 2007). Večina študij se osredotoča predvsem na prisotnost in učinkovitost odstranjevanja farmacevtikov v čistilnih napravah, medtem ko je vpliv farmacevtikov na mikrobnouzdružbo v AB čistilnih naprav razmeroma slabo preučen. Pomembno vlogo pri čiščenju OV imajo bakterije, ki so odgovorne za pretvorbo škodljivih onesnaževal (vključno s farmacevtiki) v neškodljive spojine pred spustom v okolje, zato je za oblikovanje učinkovitih čistilnih tehnologij zelo pomembno razumevanje njihovega odziva na farmacevtike v OV.

Kraigher in sodelavci (2008) so ugotovili, da prisotnost farmacevtikov v OV signifikantno zmanjša pestrost bakterijske združbe v AB. Podobno so ugotovile še nekatere druge študije (Topalova in sod., 1999; Li in Jin, 2009). Študije o vplivu antiepileptika karbamazepina, ki je derivat dibenzadiazepinov, so pokazale, da ob prisotnosti karbamazepina v OV ni bilo zaznati večjih sprememb v sestavi bakterijske združbe v AB (Wang in sod., 2008; Aubenneau in sod., 2010). Karbamazepin se je tudi, podobno kot DZ, izkazal za potencialno škodljivega za vodne organizme (Fent in sod., 2006; Fent, 2008) in za biološko slabo razgradljivega (Kosjek in sod., 2009b).

Do sedaj ni bila narejena še nobena študija o vplivu DZ na bakterijsko združbo v AB čistilnih naprav. Narejene so bile le analize akutne toksičnosti, ki so pokazale, da koncentracije DZ in njegovih presnovkov, ki jih najdemo v OV, niso toksične za bakterije v čistilnih napravah (Fent, 2008).

Poleg poznavanja odgovora mikrobne združbe na farmacevtike v OV, je pomembno tudi kateri encimi, ki bi lahko potencialno odstranjevali farmacevtike, se obogatijo v združbah izpostavljenih farmacevtikom. Med njimi so potencialni kandidati tudi lakaze, ki lahko nespecifično oksidirajo različne spojine, med drugim tudi farmacevtike. Čeprav so nedavne študije pokazale, da so lakaze razširjene tudi pri bakterijah (Ausec in sod., 2011a; Ausec in sod., 2011b), se večina študij osredotoča predvsem na glivne lakaze in njihovo uporabo za razgradnjo farmacevtskih učinkovin (Marco-Urrea in sod., 2009; Marco-Urrea in sod. 2010; Accinelli in sod., 2010; Lloret in sod., 2010; García-Galán in sod., 2011). Narejene so že bile raziskave o učinkoviti razgradnji DZ z glivnimi lakazami (Rodríguez-Rodríguez in sod., 2011; Rodríguez-Rodríguez in sod. 2012; Ostadhadi-Dehkordi in sod., 2012). Do sedaj ni bila objavljena še nobena študija o vplivu DZ na bakterijske lakaze ali obratno.

Namen naše raziskave je bil preučiti vpliv DZ na strukturo in filogenetsko sestavo bakterijske združbe v AB bioreaktorjev, ki so jih oblikovali Kosjek in sodelavci (2012). Zanimalo nas je predvsem, če se razlike v učinkovitosti odstranjevanja DZ med bioreaktorjem (Preglednica 8) odražajo tudi na strukturi bakterijske združbe. Istočasno smo z identifikacijo lakaznih genov proteobakterij želeli preveriti njihovo prisotnost in raznolikost znotraj bioreaktorjev.

### **5.1.1 Vpliv diazepama na strukturo bakterijske združbe**

Analiza profilov DGGE gena za 16S rRNA je pokazala, da bakterijska združba bioreaktorjev že na začetku obratovanja ni bila enaka. V časovni točki w0 je bila podobnost profilov DGGE bioreaktorjev X1 in X2 s kontrolnim bioreaktorjem manj kot 30 %, medtem ko sta imeli bakterijski združbi bioreaktorjev X1 in X2 v tej točki 40 % podobnost.

Glede na profil DGGE se je struktura bakterijske združbe najmanj spremenjala v kontrolnem bioreaktorju, kjer je bila tudi raznolikost bakterijske združbe 6–34 % večja, kot v bioreaktorjih X1 in X2, ki sta se ob koncu obratovanja približala kontrolnemu bioreaktorju.

Bioreaktorja X1 in X2 sta imela po časovnih točkah podobno strukturo bakterijske združbe. Na začetku obratovanja (w0 in w14) sta imela bioreaktorja X1 in X2 18–25 % manj raznoliko bakterijsko združbo kot ob koncu obratovanja (w65 in w66), ko se je zgodil preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ (za 9 % v bioreaktorju X1 oz. 53 % v bioreaktorju X2). V tem obdobju je bila bakterijska raznolikost bioreaktorjev X1 in X2 še vedno 8–11 % manjša kot v kontrolnem bioreaktorju.

Glede na to, da so bili bioreaktorji že na začetku zelo različni, morebitnega vpliva DZ na bakterijsko združbo ne moremo potrditi. Medtem, ko je bila bakterijska združba v kontrolnem bioreaktorju stabilna, se je v bioreaktorjih X1 in X2 po času spremenjala. Na podlagi dobljenih rezultatov predvidevamo, da je bila tekom obratovanja bakterijska združba v kontrolnem bioreaktorju že v stacionarni fazì rasti in zato stabilna, medtem ko sta bila bioreaktorja X1 in X2 šele v fazì adaptacije. Razlog za to je v postavitvi vseh treh bioreaktorjev, ki ni potekala na enak način: kontrolni bioreaktor je bil postavljen in deluječ 5 let prej kot ostala dva, ki sta bila pripravljena naknadno, in sicer z AB iz predhodno vzpostavljenih bioreaktorjev za odstranjevanje farmakoloških učinkovin. Ker se je bakterijska pestrost v bioreaktorjih X1 in X2 ob koncu obratovanja povečala predvidevamo, da DZ v preučevani koncentraciji (100 µg/l) ni toksičen za prisotno bakterijsko združbo.

### 5.1.2 Vpliv diazepama na sestavo bakterijske združbe

Ker se je v bioreaktorju X2 zgodil večji preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ nas je zanimalo, ali lahko spremembo zaznamo v sestavi bakterijske združbe bioreaktorjev X1 in X2. Filogenetska analiza je pokazala, da je bakterijska združba bioreaktorjev pesta in da so razlike v sestavi bakterijske združbe med bioreaktorjem minimalne. S pripravo genskih knjižnic smo uspeli zajeti le 13–40 % ocenjene bakterijske pestrosti v bioreaktorjih. Da je pestrost izjemna, so pokazale tudi visoke vrednosti indeksov vrstne bogatosti in pestrosti, ki daleč presegajo vrednosti, ki so jih opisali v ekstremnih okoljih (Pašić in sod., 2007). To pomeni, da predstavljajo bioreaktorji s hranili bogat habitat, ki omogoča življenje velikemu številu različnih mikroorganizmov.

V obeh bioreaktorjih so prevladovale po Gramu negativne bakterije, od katerih so večino predstavljale proteobakterije. Medtem ko smo nekatere sekvene lahko uvrstili v rodove pa večine sekven (90 %) nismo mogli. Te so bile najbolj podobne sekvenam, ki so jih že opisali v AB iz komunalnih čistilnih naprav. Po Gramu pozitivnih bakterij v AB bioreaktorjev nismo našli, z izjemo ene same sekvene iz bioreaktorja X1, ki se je uvrstila v klostridijsko skupino Family Incertae Sedis XIII znotraj debla *Firmicutes*.

Predstavniki razreda *Betaproteobacteria* so prevladovali v bioreaktorju X2 (30 %) in so bili druga najpogosteža skupina v bioreaktorju X1 (30 %). Rezultati sovpadajo z analizami drugih študij, ki so v AB čistilnih naprav prav tako dokazale dominanco bakterij iz razreda *Betaproteobacteria* (Hiraishi in sod., 2000; Wagner in Loy, 2002; Kraigher in sod., 2008). Večji delež betaproteobakterijskih sekven smo uvrstili v rod *Sphaerotilus*, ki skupaj z drugimi heterotrofnimi bakterijami igra pomembno vlogo pri oksidaciji ogljikovih organskih spojin v čistilnih napravah, ob pretiranem razrastu pa povzroča penjenje in zmanjša učinkovitost čiščenja OV (Gray, 2004). Za penjenje je velikokrat odgovorna vrsta *Sphaerotilus natans* (Ruchhoft in Kachmar, 1941; Ramothokang in sod., 2004), ki smo jo našli v AB iz bioreaktorja X1. V betaproteobakterijski rod *Nitrosomonas*, ki je v čistilnih napravah odgovoren za oksidacijo amonija do nitrita (Wagner in Loy, 2002), so se uvrstile predvsem sekvene iz bioreaktorja X1.

Predstavniki razreda *Alphaproteobacteria* so bili tretja najpogosteje zastopana skupina v AB bioreaktorjev X1 (9 %) in X2 (14 %). Med alfabakterijami so prevladovali predstavniki rodu *Rhodobacter*. Gre za škrlatne nežveplove bakterije, ki pogosto naseljujejo aerobne sisteme za čiščenje OV. So fakultativni fotoheterotrofi, ki lahko pridobivajo energijo z anaerobno fotosintezo, aerobnim dihanjem ali denitrifikacijo. Kot fototrofni denitrifikatorji igrajo pomembno vlogo pri odstranjevanju dušika iz OV (Hiraishi in sod., 1995). V bioreaktorju X2 smo našli alfabakterijsko vrsto *Sphingosinicella xenopeptidilytica*, ki so jo nedavno izolirali iz čistilne naprave in za katero je bilo ugotovljeno, da ima izjemno sposobnost razgradnje sintetičnih beta peptidov, kot so nekateri farmacevtiki (npr. beta blokatorji) (Geueke in sod., 2007).

V bioreaktorju X2 smo zasledili filamentozno vrsto *Thiothrix eikelboom* iz razreda *Gammaproteobacteria*, ki je ena od pogostejših povzročiteljic penjenja v čistilnih napravah (Richard in sod., 1985; Kanagawa in sod., 2000; Gray, 2004). V bioreaktorju X1 smo našli anaerobno vrsto *Desulfomicrobium baculum* iz razreda *Deltaproteobacteria*, ki primarno naseljuje sladkovodne in brakične vode, našli pa so jo tudi v OV iz proizvodnje penicilina na Kitajskem (Copeland in sod., 2009).

V obeh bioreaktorjih smo našli tudi fotosintetske bakterije iz debel *Chloroflexi* in *Chlorobi*. Gre za obligatno anaerobne fotoavtotrofne bakterije, ki znotraj aerobnega bioreaktorja naseljujejo anaerobne mikrobne niše. Predstavnike iz debla *Chlorobi* smo zasledili predvsem v bioreaktorju X2. Filamentozni predstavniki debla *Chloroflexi*, ki lahko ob preobsežni razrasti v čistilnih napravah povzročajo penjenje in s tem poslabšajo učinkovitost čiščenja OV (Kraglund in sod., 2007), so prevladovali v bioreaktorju X1 (35 %) in so bili druga najbolj zastopana skupina v bioreaktorju X2 (20 %).

V obeh bioreaktorjih smo našli tudi predstavnike debel *Bacteroidetes* in *Acidobacteria*, medtem ko so v deblih *Nitrospira* in *Planctomycetes* prevladovale sekvence iz bioreaktorja X2, vendar so le-te predstavljalne manjši delež (5 %) znotraj knjižnic. Sekvence predstavnikov debla *Nitrospira*, ki so v AB čistilnih naprav med najpogosteje opisanimi nitrit oksidirajočimi bakterijami (Wagner in Loy, 2002), smo izolirali predvsem iz bioreaktorja X2.

Kljub temu, da je bila učinkovitost odstranjevanja DZ med bioreaktorjem X1 in X2 različna (Preglednica 8), je analiza klonskih knjižnic pokazala, da se dominantne skupine bakterij v AB bioreaktorjev ne razlikujejo (Sliki 11 in 14). V bioreaktorju X1 smo sicer zaznali nekoliko večji delež filamentoznih predstavnikov debla *Chloroflexi* in filamentozno betaproteobakterijo *Sphaerotilus natans*, kar bi lahko doprineslo k manjši učinkovitosti čiščenja, vendar pa po poročanju Kosjek in sodelavcev (2012) penjenja v bioreaktorju niso zaznali, zato tega ne moremo z gotovostjo trditi. Poleg tega smo v bioreaktorju X2, kjer se je zgodil večji preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ, zaznali filamentozno gamaproteobakterijo *Thiothrix eikelboom*, ki velja za pogosto povzročiteljico penjenja v čistilnih napravah.

Ker večjih razlik v sestavi bakterijske združbe med bioreaktorjem nismo zaznali, ne moremo izpostaviti določenih skupin v X2, odgovornih za večji preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ. Verjetno bi za boljši pogled v sestavo mikrobnih združb obeh bioreaktorjev morali uporabiti drugačno metodo, kot je npr. globoko sekvenciranje genov za 16S rRNA.

### 5.1.3 Vpliv diazepama na raznolikost genov za lakaze proteobakterij

Podobno kot pri analizi profilov DGGE bakterijskih genov za 16S rRNA, je tudi analiza profilov DGGE lakaznih genov proteobakterij pokazala, da je bila raznolikost proteobakterijskih lakaz med bioreaktorji že na začetku zelo različna. V časovni točki  $w_0$  je bila podobnost profilov DGGE bioreaktorjev X1 in X2 s kontrolnim bioreaktorjem le 20 %.

Glede na število lis v profilu DGGE je bila raznolikost proteobakterijskih lakaz največja v kontrolnem bioreaktorju. Na začetku obratovanja ( $w_0$  in  $w_{14}$ ) bioreaktorjev X1 in X2 je bila raznolikost proteobakterijskih lakaz za 44–69 % manjša kot ob koncu obratovanja ( $w_{65}$  in  $w_{66}$ ). V tej točki je postal profil DGGE bioreaktorjev X1 in X2 podoben profilu kontrolnega bioreaktorja.

Sekvenciranje izbranih lis je pokazalo, da so se v bioreaktorjih obogatili geni za domnevne lakaze iz razreda *Alphaproteobacteria*, predstavniki katerega so bili tudi tretji najbolj zastopani v knjižnicah gena za 16S rRNA iz obeh bioreaktorjev. V bioreaktorjih X1 in X2 se je ob koncu obratovanja, ko se je zgodil preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ (za 9 % v bioreaktorju X1 in 53 % v bioreaktorju X2), obogatila sekvenca, katere najbližji sorodnik je *Sulfitobacter* sp. iz družine *Rhodobacteraceae*. Gre za heterotrofno bakterijo, ki primarno naseljuje morska okolja in vrši oksidacijo sulfita (Sorokin, 1995). Tudi v knjižnicah gena za 16S rRNA smo v obeh bioreaktorjih zaznali predstavnike iz družine *Rhodobacteraceae*, predvsem rod *Rhodobacter*, ki v čistilnih napravah sodeluje pri odstranjevanju dušika (Hiraishi in sod., 1995).

Ker so bili bioreaktorji že na začetku obratovanja zelo različni, morebitnega vpliva DZ na gene za lakaze proteobakterij ne moremo potrditi. Glede na to, da se je raznolikost proteobakterijskih lakaz v bioreaktorjih z dodatkom DZ ob koncu obratovanja povečala predvidevamo, da DZ v preučevani koncentraciji (100 µg/l) ni toksičen za prisotno združbo proteobakterij.

## 5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov našega raziskovalnega dela lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Z DGGE analizo smo v bioreaktorjih z dodatkom DZ zaznali pestro združbo bakterijskih genov za 16S rRNA in lakaznih genov proteobakterij.
- V AB obeh bioreaktorjev so prevladovali predstavniki skupin *Proteobacteria* (predvsem *Betaproteobacteria*) in *Chloroflexi*.
- Kljub razlikam v učinkovitosti odstranjevanja DZ med bioreaktorjem, razlik v sestavi bakterijske združbe nismo zaznali.
- Ob koncu obratovanja so se v bioreaktorjih z dodatkom DZ obogatile sekvene lakaznih genov proteobakterij iz razreda *Alphaproteobacteria*.
- Vpliva DZ na sestavo bakterijske združbe v AB bioreaktorjev nismo potrdili.
- Glede na veliko pestrost bakterijske združbe v AB z dodatkom DZ predvidevamo, da DZ v koncentraciji 100 µg/l ni toksičen za bakterije v AB bioreaktorjev.

Zaradi relativno slabe pokritosti mikrobne pestrosti (13–40 %) predvidevamo, da je za preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ odgovoren majhen delež bakterijske združbe v AB bioreaktorjev. Za določitev teh vrst bi bila potrebna analiza dodatnih klonov, še bolje pa bi bilo uporabiti nove metode sekvenciranja, ki omogočajo identifikacijo predstavnikov, ki so v manjšini in ne le dominantnih taksonov, ki jih vidimo s kloniranjem. Da bi lahko kar najbolje opisali mikrobno združbo bioreaktorjev predlagamo, da se v bodoče v eksperiment vključi kot kontrola bioreaktor, ki se ga postavi istočasno kot tretirane bioreaktorje.

## 6 POVZETEK

V raziskavi smo proučevali vpliv DZ na bakterijsko združbo v AB pilotnih čistilnih naprav. Zanimalo nas je, če se razlike v učinkovitosti odstranjevanja DZ med dvema bioreaktorjem odražajo na strukturi in filogenetski sestavi bakterijske združbe. Hkrati smo želeli preveriti, kakšen vpliv ima DZ na prisotnost in raznolikost genov, ki kodirajo lakaze proteobakterij, encime, ki imajo potencial za odstranjevanje različnih okoljskih onesnaževal, med drugim tudi farmacevtikov.

Na podlagi profilov DGGE bakterijskih genov za 16S rRNA in lakaznih genov proteobakterij smo ugotovili, da je celotna bakterijska in proteobakterijska združba v kontrolnem bioreaktorju (R0) in v bioreaktorjih z dodatkom DZ (X1 in X2) ob koncu obratovanja pestra. Razlike v sestavi bakterijskih združb AB bioreaktorjev so bile prisotne že na samem začetku obratovanja, tj. še pred dodatkom DZ, zato smo kontrolni bioreaktor izključili iz nadaljnje analize in se osredotočili na zadnji teden obratovanja (w66) bioreaktorjev z dodatkom DZ, ko je prišlo do preskoka v učinkovitosti odstranjevanja DZ (za 9 % v bioreaktorju X1 in 53 % v bioreaktorju X2). Z analizo klonskih knjižnic gena za 16S rRNA smo ugotovili, da se razlike v učinkovitosti odstranjevanja DZ med dvema bioreaktorjem ne odražajo na strukturi in filogenetski sestavi bakterijske združbe, saj so se zaporedja iz obeh bioreaktorjev uvrstila v iste filogenetske skupine v podobnih deležih. Prevladovali so predstavniki iz debel *Proteobacteria* in *Chloroflexi*. V obeh bioreaktorjih smo našli enak odstotek (30 %) predstnikov razreda *Betaproteobacteria*, medtem ko je bil delež predstnikov debla *Chloroflexi* nekoliko večji v bioreaktorju X1. Analiza lakaznih genov proteobakterij je pokazala, da so se v obeh bioreaktorjih obogatile lakaze iz razreda *Alphaproteobacteria*. Predstavniki tega razreda so bili tretja najpogosteje zastopana skupina v knjižnicah gena za 16S rRNA iz AB obeh bioreaktorjev.

Relativno visoka pestrost bakterij v bioreaktorjih z DZ kaže, da DZ v preučevani koncentraciji (100 µg/l) ni toksičen za bakterije v AB čistilnih naprav. Ker večjih razlik v sestavi bakterijske združbe med bioreaktorjem nismo zaznali, predvidevamo da so v bioreaktorju X2 predstavniki, ki so prisotni v AB v manjšem deležu, odgovorni za dramatičen preskok v učinkovitosti odstranjevanja DZ. Zaradi relativno slabe pokritosti mikrobne raznolikosti bi bilo za določitev teh vrst potrebno izvesti dodatne mikrobiološke analize, kot so npr. bogativne sevov na gojiščih z DZ, kot edinim virom ogljika. Poleg tega bi manjšinske predstavnike lahko sledili tudi z globokim sekvenciranjem izbranih genov.

## 7 VIRI

Accinelli C., Sacca M.L., Batisson I., Fick J., Mencarelli M., Grbic R. 2010. Removal of oseltamivir (Tamiflu) and other selected pharmaceuticals from wastewater using a granular bioplastic formulation entrapping propagules of *Phanerochaete chrysosporium*. Chemosphere, 81, 3: 436-443

Alexandre G., Zhulin I.B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. Trends in Biotechnology, 18, 2: 41-42

Applied Maths NV. 2012. BioNumerics, version 7.0. Sint-Martens-Latem, Applied Maths NV: software.

<http://www.applied-maths.com/> (5. september 2012)

Arias M.E., Arenas M., Rodríguez R., Soliveri J., Ball A.S., Hernández M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4: 1953-1958

Ausec L., Elsas J.D., Mandić-Mulec I. 2011a. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. Soil Biology & Biochemistry, 43, 5: 975-983

Ausec L., Zakrzewski M., Goesmann A., Schlüter A., Mandić-Mulec I. 2011b. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. PLoS ONE, 6, 10: e25724, doi:10.1371/journal.pone.0025724: 9 str.

Beer M., Seviour E.M., Kong Y., Cunningham M., Blackall L.L., Seviour R.J. 2002. Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence *in situ* identification in activated sludge. FEMS Microbiology Letters, 207, 2: 179-183

Björnsson L., Hugenholtz P., Tyson G.W., Blackall L.L. 2002. Filamentous *Chloroflexi* (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. Microbiology, 148: 2309-2318

Christensen F.M. 1998. Pharmaceuticals in the environment – a human risk? Regulatory Toxicology and Pharmacology, 28, 3: 212-221

CodonCode. 2013. CodonCode Aligner, version 4.0.4. Centerville, CodonCode Corporation: software.  
<http://www.codoncode.com/aligner/> (24. januar 2013)

Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. 1993. Official Journal of the European Communities, 36, L227: 9-18

Copeland A., Spring S., Göker M., Schneider S., Lapidus A., Glavina Del Rio T., Tice H., Cheng J.F., Lucas S., Chen F., Nolan M., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.J., Jeffries C.C., Meincke L., Sims D., Brettin T., Detter J.C., Han C., Chain P., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P. 2009. Complete genome sequence of *Desulfomicobium baculumatum* type strain (XT). Standards in Genomic Sciences, 1, 1: 29-37

Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. 2001. Official Journal of the European Communities, 44, L311: 67-128

Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 2-3: 143-152

Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P., Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68, 2: 117-128

Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27, 16: 2194-2200

Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes – Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17, 19: 7843-7853

Fang H., Cai L., Yu Y., Zhang T. 2013. Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. Bioresource Technology, 129: 209-218

- Farré M.L., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barceló D. 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*, 938, 1-2: 187–197
- Fent K., Weston A.A., Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 2: 122-159
- Fent K. 2008. Effects of pharmaceuticals on aquatic organisms. V: Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. 3<sup>rd</sup> ed. Kümmerer K. (ed.). Berlin, Springer: 175-203
- Fürst J., Peklar J., Samaluk V. 2006. Poraba anksiolitikov ter hipnotikov in sedativov v Sloveniji. *Zdravstveno Varstvo*, 45: 150-157
- García-Galán M.J., Rodríguez-Rodríguez C.E., Vicent T., Caminal G., Díaz-Cruz M.S., Barceló D. 2011. Biodegradation of sufamethazine by *Trametes versicolor*: removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-QqTOF-MS. *Science of the Total Environment*, 409, 24: 5505-5512
- Geueke B., Busse H.J., Fleischmann T., Kämpfer P., Kohler H.P.E. 2007. Description of *Sphingosinicella xenopeptidilytica* sp. nov., a β-peptide-degrading species, and emended descriptions of the genus *Sphingosinicella* and the species *Sphingosinicella microcystinivorans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 107-113
- Gray N.F. 2004. Biology of wastewater treatment. 2<sup>nd</sup> ed. London, Imperial College Press: 1421 str.
- Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 108, 2: 205-210
- Goodkin H.P. 2010. Diazepam. V: Atlas of epilepsies. Panayiotopoulos C.P. (ed.). Berlin, Springer: 1727-1732
- Gómez M.J., Martínez Bueno M.J., Lacorte S., Fernández-Alba A.R., Agüera A. 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66, 6: 993–1002

Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere*, 36, 2: 357-394

Henze M., Harremoës P., Arvin E., la Cour Jansen J. 2002. Wastewater treatment: biological and chemical processes. 3<sup>rd</sup> ed. Berlin, Springer: 433 str.

Hiraishi A., Muramatsu K., Urata K. 1995. Characterization of new denitrifying *Rhodobacter* strains isolated from photosynthetic sludge for wastewater treatment. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 1: 39-44

Hiraishi A., Iwasaki M., Shinjo H. 2000. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 2: 148-156

Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kües U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*, 273, 10: 2308-2326

Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M., Barcelo D. 2011. Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment. *Water Research*, 45, 3: 1165-1176

Juwarkar A.A., Singh S.K., Mudhoo A. 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 9, 3: 215-288

Kanagawa T., Kamagata Y., Aruga S., Kohno T., Horn M., Wagner M. 2000. Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 11: 5043-5052

Kellner H., Luis P., Zimdars B., Kiesel B., Buscot F. 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 3: 638-648

Kosjek T., Heath E., Krbavčič A. 2005. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International*, 31, 5: 679-685

Kosjek T., Heath E., Kompare B. 2007. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 4: 1379-1387

- Kosjek T., Heath E., Perez S., Petrović M., Barcelo D. 2009a. Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 379, 1-4: 109-117
- Kosjek T., Andersen H.R., Kompare B., Ledin A., Heath E. 2009b. Fate of carbamazepine during water treatment. *Environmental Science and Technology*, 43, 16: 6256-6261
- Kosjek T., Perko S., Zupanc M., Zanoški Hren M., Landeka Dragičević T., Žigon D., Kompare B., Heath E. 2012. Environmental occurrence, fate and transformation of benzodiazepines in water treatment. *Water Research*, 46: 355-368
- Kraglund C., Levantesi C., Borger A., Thelen K., Eikelboom D., Tandoi V., Kong Y., van der Waarde J., Krooneman J., Rossetti S., Rolighed Thomsen T., Halkjaer Nielsen P. 2007. Identity, abundance and ecophysiology of filamentous *Chloroflexi* species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 59, 3: 671-682
- Kraigher B., Kosjek T., Heath E., Kompare B., Mandić-Mulec I. 2008. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Research*, 42, 17: 4578-4588
- Kraigher B., Mandić-Mulec I. 2011. Nitrification activity and community structure of nitrite-oxidizing bacteria in the bioreactors operated with addition of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 188, 1-3: 78-84
- Kümmerer K. 2008. Pharmaceuticals in the environment – a brief summary. V: Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. 3<sup>rd</sup> ed. Kümmerer K. (ed.). Berlin, Springer: 3-21
- Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 20: 6955-6959
- Li J., Jin Z. 2009. Effect of hypersaline aniline-containing pharmaceutical wastewater on the structure of activated sludge-derived bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 1: 432-438

Lloret L., Eibes G., Lu-Chau T.A., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. 2010. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51, 3: 124-131

Löffler D., Römbke J., Meller M., Ternes T.A. 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental Science and Technology*, 39, 14: 5209-5218

Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhukumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Förster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A.W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., König A., Liss T., Lüßmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer KH. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, 32, 4: 1363-1371

Majeau J.A., Brar S.K., Tyagi R.D. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101, 7: 2331-2350

Malliga P., Uma L., Subramanian G. 1996. Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer. *Microbios*, 86, 348: 175-183

Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G. 2009. Ability of white rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74, 6: 765–772

Marco-Urrea E., Perez-Trujillo M., Blanquez P., Vicent T., Gloria Caminal G. 2010. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. *Bioresource Technology*, 101, 7: 2159–2166

Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21: 18849-18859

McMaster M.C. 2008. GC/MS: a practical user's guide. 2<sup>nd</sup> ed. New Jersey, John Wiley & Sons: 180 str.

MoBio Laboratories, Inc. 2010. Instruction manual: PowerSoil<sup>®</sup> DNA isolation kit. Carlsbad, MoBio Laboratories, Inc.: 20 str.

Monteiro S.C., Boxall A.B.A. 2010. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 202: 53-154

Morozova O.V., Shumakovitch G.P., Shleev S.V., Yaropolov Y.I. 2007. Laccase – mediator systems and their applications: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 5: 523-535

Muyzer G., De Wall E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700

Nakamura K., Kawabata T., Yura K., Go N. 2003. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS Letters*, 553, 3: 239-244

NCBI. 2013. BLAST-Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: software  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (24. januar 2013)

Olkkola K.T., Ahonen J. 2008. Midazolam and other benzodiazepines. V: Modern anesthetics. Handbook of experimental pharmacology 182. Schüttler J., Schwilden H. (eds.). Berlin, Springer: 335-359

Ostadhadi-Dehkordi S., Tabatabaei-Sameni M., Forootanfar H., Kolahdouz S., Ghazi-Khansari M., Faramarzi M.A. 2012. Degradation of some benzodiazepines by a laccase-mediated system in aqueous solution. *Bioresource Technology*, 125: 344-347

Pašić L., Poklar Ulrich N., Črnigoj M., Grabnar M., Herzog Velikonja B. 2007. Haloarchaeal communities in the crystallizers of two adriatic solar salterns. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 1: 8-18

Promega Corporation. 2010. Technical manual no. 042: pGEM®-T and pGEM®-T Easy vector systems, instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610. Madison, Promega Corporation: 28 str.

QIAGEN. 2008. QIAquic® spin handbook. Stanford, QIAGEN: 44 str.

R Core Team. 2012. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing: software  
<http://www.R-project.org> (21. februar 2013)

Ramothokang T.R., Drysdale G.D., Bux F. 2004. Isolation and cultivation of filamentous bacteria implicated in activated sludge bulking. Water SA, 29, 4: 405-410

Richard M.G., Shimzu G.P., Jenkins D. 1985. The growth physiology of the filamentous organism type 021N and its significance to activated sludge bulking. Journal Water Pollution Control Federation, 57, 12: 1152-1162

Rodríguez Couto S., Toca-Herrera J.L. 2006. Lacasses in the textile industry. Biotechnology and Molecular Biology Review, 1, 4: 115-120

Rodríguez-Rodríguez C.E., Jelić A., Llorca M., Farré M., Caminal G., Petrović M., Barceló D., Vicent T. 2011. Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. Bioresource Technology, 102, 10: 5602-5608

Rodríguez-Rodríguez C.E., Baron E., Gago-Ferrero P., Jelić A., Llorca M., Farré M., Diaz-Cruz M.S., Eljarrat E., Petrović M., Caminal G., Barceló D., Vicent T. 2012. Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. Journal of Hazardous Materials, 233: 235-243

Ruchhoft C.C., Kachmar J.F. 1941. Studies of sewage purification XIV. The role of *Sphaerotilus natans* in activated sludge bulking. Public Health Reports, 56, 35: 1727-1757

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

Shah V., Jain K., Desai C., Madamwar D. 2012. Molecular analyses of microbial activities involved in bioremediation. V: Microorganisms in environmental management: microbes and environment. Satyanarayana T., Johri B.N., Prakash A. (eds.). Berlin, Springer: 221-247

Sipma J., Osuna B., Collado N., Monclús H., Ferrero G., Comas J., Rodriguez-Roda I. 2010. Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. Desalination, 250, 2: 653-659

Sorokin D.Y. 1995. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov – a new heterotrophic bacterium from the black sea, specialized on sulfite oxidation. *Microbiology*, 64, 3: 295-305

Straub J.O. 2008. Deterministic and probabilistic environmental risk assessment for diazepam. V: Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. 3<sup>rd</sup> ed. Kümmerer K. (ed.). Berlin, Springer: 343-383

Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 10: 2167-2175

Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. 2003. *Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse*. 4<sup>th</sup> ed. New York, McGraw Hill: 1848 str.

Topalova Y., Kozuharov D., Dimkov R. 1999. Adaptive response of trivial activated sludge towards toxic effect of oNP, PCP and combination oNP/PCP. *Waste Management*, 19, 4: 247-254

Uredba o emisiji snovi pri odvajanju odpadne vode iz komunalnih čistilnih naprav. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 45: 6170-6181

Verlicchi P., Aukidy M.A., Zambello E. 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment – a review. *Science of the Total Environment*, 429: 123-155

Wagner M., Loy A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 3: 218-227

Yoshida H. 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi), part 1. Communication from the Chemical Society of Tokio. *Journal of the Chemical Society*, 43: 472-486. Cit. po: Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P., Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68, 2: 117-128

## ZAHVALA

Katedri za mikrobiologijo Biotehniške fakultete in Institutu Jožef Stefan, ki sta mi omogočila izdelavo te naloge.

Mentorici prof. dr. Ines Mandič-Mulec in somentorici prof. dr. Ester Heath, za dragocene komentarje in predloge pri pisanju naloge.

Recenzentki prof. dr. Romani Marinšek Logar in predsedniku komisije prof. dr. Petru Rasporju, za hiter odziv in sodelovanje.

Vesni Jerman in Luku Ausecu, za strokovnost in nesebično pomoč pri praktičnem delu.

Vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo Biotehniške fakultete, za koristne nasvete pri eksperimentalnem delu.

Vsem mojim bližnjim, ki že od vsega začetka verjamejo vame in me podpirajo.  
Mama, ati, Miha, brez vas danes ne bi bila to kar sem.

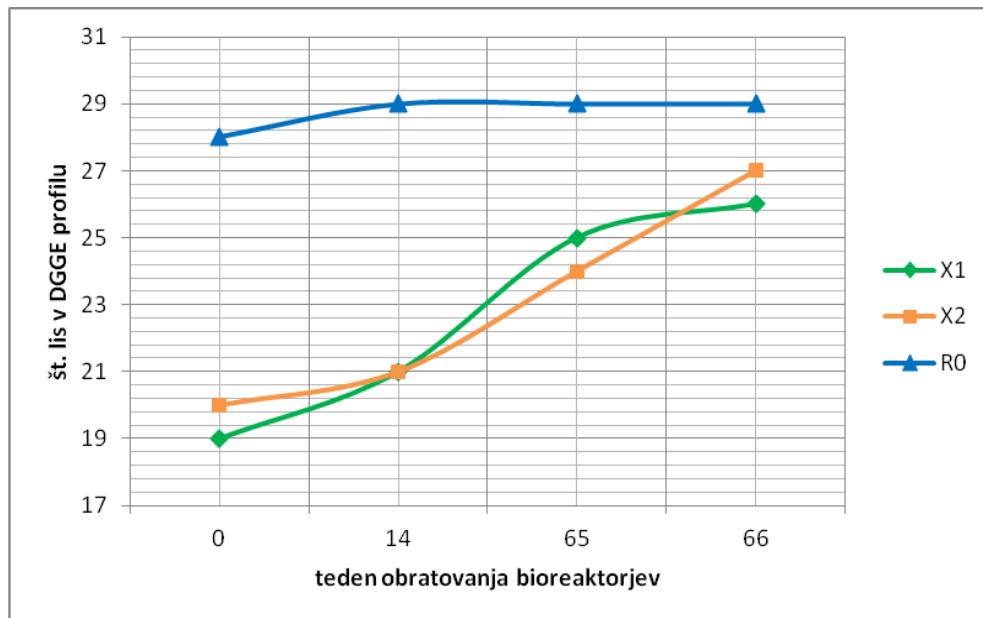
Fantu Gregu, ki me osrečuje in Tjaši, ker se lahko zanesem nanjo.

Nečakoma, Binetu in Liji, ki mi s svojo razigranostjo dajeta energijo za nove podvige.

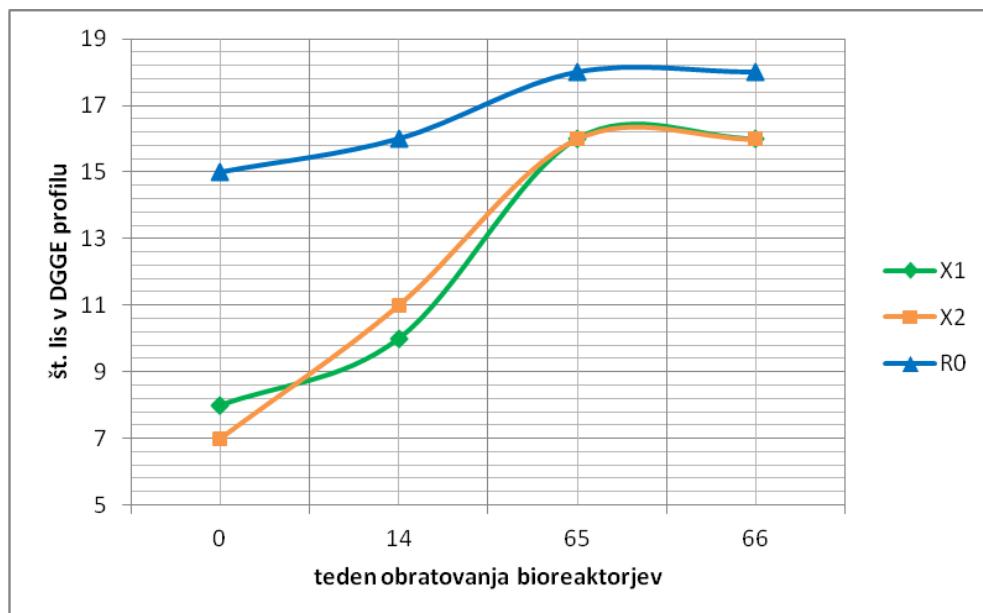
Teti, za prekmurske dobrote in občutek domačnosti sredi Ljubljane.

In ne nazadnje, sošolcem in prijateljem, ki so poskrbeli za smeh, spodbudo in čudovite spomine na študijska leta.

## PRILOGE



**Priloga A:** Raznolikost bakterijskih genov za 16S rRNA v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in v kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja.



**Priloga B:** Raznolikost genov za lakaze proteobakterij v bioreaktorjih z dodatkom diazepama (X1, X2) in v kontrolnem bioreaktorju (R0) tekom enoletnega obratovanja.