

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja GORENC

**OPIS MOBILNIH GENETSKIH ELEMENTOV IN
ODPORNOSTI PROTI MONENZINU PRI
BAKTERIJAH IZ RODOV *Prevotella* IN *Bacteroides***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katja GORENC

**OPIS MOBILNIH GENETSKIH ELEMENTOV IN ODPORNOSTI
PROTI MONENZINU PRI BAKTERIJAH IZ RODOV**

Prevotella* IN *Bacteroides

DOKTORSKA DISERTACIJA

**CHARACTERISATION OF MOBILE GENETIC ELEMENTS AND
MONENSIN RESISTANCE IN BACTERIA FROM GENERA**

Prevotella* AND *Bacteroides

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analiza dolgoverižnih maščobnih kislin je bila opravljena v Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor, mikroskopiranje s presevnim elektronskim mikroskopom pa na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 20. septembra 2010 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja genetike. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: doc. dr. Tomaž ACCETTO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Maja RUPNIK
Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta
Zavod za zdravstveno varstvo Maribor

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.

Katja Gorenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 579:575(043.3)=163.6
KG mikrobiologija/molekularna genetika/horizontalni genski prenos/konjugativni transpozoni/antibiotiki/odpornost/monenzin/*Prevotella/Bacteroides*
KK AGRIS /
AV GORENC, Katja, univ. dipl. mikrobiol.
SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij Bioloških in biotehniških znanosti, področje Genetika
LI 2013
IN OPIS MOBILNIH GENETSKIH ELEMENTOV IN ODPORNOSTI PROTI MONENZINU PRI BAKTERIJAH IZ RODOV *Prevotella* IN *Bacteroides*
TD Doktorska disertacija
OP XII, 101 str., 18 pregl., 26 sl., 142 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Konjugativni transpozoni so pogosti in pomembni mobilni genetski elementi pri razširjanju odpornosti proti antibiotikom v bakterijah iz rodu *Bacteroides*, ni pa znano, ali je tako tudi v bližnjem rodu *Prevotella*. Opisali smo hipotetični transpozon CTnB₁4 v vampni bakteriji *Prevotella bryantii* B₁4, ki je podoben velikima konjugativnim transpozonomu CTnBST iz bakterije *Bacteroides uniformis* WH207 in CTn3-Bf iz bakterije *Bacteroides fragilis* YCH46. Vsem trem transpozonom sta skupni regiji tra in GG, v katerih je vrstni red genov ohranjen, aminokislinska podobnost pa visoka. Regiji sta ohranjeni v genomih več vrst iz rodu *Bacteroides*, kar kaže na razširjenost takšnih elementov. V CTnB₁4 smo odkrili tudi večjo skupino genov za metabolizem sladkorjev in polisaharidov, ki spominja na lokuse za izkoriščanje polisaharidov (ang. polysaccharide utilization loci), ki so bili opisani v vrstah iz rodu *Bacteroides*. V drugem delu disertacije smo preučevali mehanizem odpornosti bakterij proti ionoformnim antibiotikom. Zaradi bojazni nekontroliranega razširjanja odpornosti proti antibiotikom so leta 2006 v EU prepovedali uporabo antibiotikov kot krmnih dodatkov v živinoreji. Zaradi nepoznavanja narave mehanizma odpornosti in pomanjkanja dokazov o možnem horizontalnem širjenju odpornosti proti ionoformnemu antibiotiku monenzinu, ki se še uporablja kot krmni dodatek pri reji govedi v ZDA in nekaterih drugih državah, smo preučevali mehanizem odpornosti na ta antibiotik pri bakterijah *Prevotella ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁4. Primerjali smo fenotipske, metabolne in genetske značilnosti divjih tipov ter njunih adaptant na monenzin. Med njimi smo zaznali razlike v sestavi produktov fermentacije, v profilu membranskih maščobnih kislin in tudi v genomskem zapisu. Še posebej pomembno je odkritje, da se je ob odpornosti preučevanih bakterij proti monenzinu sočasno pojavila tudi odpornost na nekatere antibiotike, ki jih sicer uporabljamo v humani ali veterinarski medicini. Narave mehanizma odpornosti sicer nismo razkrili, smo pa pokazali, da gre verjetno za genetski mehanizem, saj se je odpornost obdržala tudi po mnogokratnem precepljanju na monenzin odpornih adaptant, ko smo jih gojili v gojišču brez monenzina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579:575(043.3)=163.6
CX microbiology/molecular genetics/horizontal gene transfer/conjugative transposons/antibiotic resistance/monensin/*Prevotella/Bacteroides*
CC AGRIS /
AU GORENC, Katja
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY 2013
TI CHARACTERISATION OF MOBILE GENETIC ELEMENTS AND MONENSIN RESISTANCE IN BACTERIA FROM GENERA *Prevotella* AND *Bacteroides*
DT Doctoral dissertation
NO XII, 101 p., 18 tab., 26 fig., 142 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Conjugative transposons (CTns) are abundant mobile genetic elements playing an important role in dissemination of antibiotic resistances in bacteria from genus *Bacteroides*. It is not known, however, if the same is true in the related genus *Prevotella*. Bioinformatic evidence of the presence of a large conjugative transposon in the ruminal bacterium *Prevotella bryantii* B₁4 is presented. The described CTn appears to be related to the large conjugative transposon CTnBST, described in *Bacteroides uniformis* WH207, and to CTn3-Bf from *Bacteroides fragilis* YCH46. All three CTns share the *tra* regions and the newly discovered GG regions, both with high amino acid identity and clearly conserved gene order. The regions are conserved in several species from the genus *Bacteroides*, which indicates wide dissemination of such elements. A cluster of genes involved in sugar utilization and metabolism was discovered within the hypothetical CTnB₁4, to a certain extent resembling the polysaccharide utilization loci described in *Bacteroides* species. In the second part of the dissertation the bacterial resistance mechanism against ionophoric antibiotics was studied. Due to fear of uncontrolled dissemination of antibiotic resistances the use of antibiotics as feed additives in animal husbandry was banned in EU in 2006. Since the exact mechanism of bacterial resistance to the ionophore monensin, which is still used in USA and some other countries, is not understood, and the ideas about the possible lateral transfer of the monensin resistance among gut bacteria lack evidence, our aim was to investigate the possible resistance mechanism in *P. bryantii* B₁4 and *P. ruminicola* 23. We compared phenotypic, metabolic and genetic traits of wild type strains and their descendants adapted to monensin. Differences in the profiles of fermentation products, membrane fatty acids and in genomic sequences were detected. Particularly important is the finding that resistance to some other antibiotics, which are also used in human and veterinary medicine, appeared together with the resistance towards monensin in studied bacteria. The resistance mechanism was not elucidated. However, it has been shown, that it is most likely of genetic nature, since the resistance was sustained after many subcultivations of the monensin resistant adaptants in a medium without monensin.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE IZ RODOV <i>Prevotella</i> IN <i>Bacteroides</i>	3
2.2 HORIZONTALNI GENSKI PRENOS IN MOBILNI GENETSKI ELEMENTI.....	6
2.2.1 Mobilni genetski elementi in način prenosa.....	7
2.2.1.1 Konjugativni elementi bakterij iz rodu <i>Bacteroides</i>	12
2.2.1.2 Konjugativni elementi bakterij iz rodu <i>Prevotella</i>	14
2.2.2 Pogostost horizontalnih genskih prenosov.....	15
2.2.3 Prepoznavanje konjugativnih transpozonov in genov pridobljenih s HGT	16
2.2.4 Horizontalni genetski prenosi v prebavnem traktu in hipoteza o rezervoarju genov za odpornost proti antibiotikom	18
2.3 ODPORNOST PROTI MONENZINU	20
2.3.1 Spreminjanje presnove v vampu	20
2.3.2 Mehanizem delovanja ionofornih antibiotikov.....	22
2.3.3 Vpliv monenzina na mikrobnno združbo vampa	23
2.3.4 Mehanizem odpornosti proti ionofornim antibiotikom	24
2.3.5 Razširjanje odpornosti proti ionofornim antibiotikom	25
3 MATERIAL IN METODE.....	28
3.1 BAKTERIJSKI SEVI.....	28
3.2 PRIPRAVA GOJIŠČA IN GOJENJE VAMPNIH BAKTERIJ	28
3.3 IZOLACIJA GENOMSKE DNA.....	29

3.4	MOBILNI GENETSKI ELEMENTI	30
3.4.1	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>traG</i>	30
3.4.2	Pomnoževanje gena <i>traG</i> z verižno reakcijo s polimerazo	31
3.4.3	Agarozna gelska elektroforeza	32
3.4.4	Priprava kompetentnih celic	33
3.4.5	Kloniranje pomnožkov gena <i>traG</i>	33
3.4.6	Izolacija plazmidne DNA in sekvenciranje	34
3.4.7	Bioinformacijska analiza hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB ₁₄	35
3.5	ODPORNOST PROTI MONENZINU	35
3.5.1	Preizkus naravne odpornosti in adaptacija divjih sevov na rast ob prisotnosti monenzina	35
3.5.2	Ohranjanje odpornosti	36
3.5.3	Analiza hlapnih maščobnih kislin in plinskih produktov fermentacije ..	36
3.5.3.1	Analiza kratkoverižnih MK	36
3.5.3.2	Analiza mlečne in jantarne kisline	37
3.5.3.3	Analiza plinskih fermentacijskih produktov	37
3.5.4	Analiza dolgoverižnih membranskih maščobnih kislin	37
3.5.5	Analiza velikosti celic v prisotnosti in odsotnosti monenzina s presevnim elektronskim mikroskopom	38
3.5.6	Odpornost proti antibiotikom	39
3.5.8	Sekvenciranje DNA in analiza genomskeh sekvenc	41
4	REZULTATI	45
4.1	MOBILNI GENETSKI ELEMENTI	45
4.1.1	Pomnoževanje gena <i>traG</i> z verižno reakcijo s polimerazo	45
4.1.2	Kloniranje pomnožkov gena <i>traG</i>	46
4.1.3	Sekvenciranje in anotacija pomnožkov gena <i>traG</i>	46
4.1.4	Opis hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB ₁₄	47
4.2	ODPORNOST PROTI MONENZINU	54
4.2.1	Preizkus naravne odpornosti in adaptacija divjih sevov na rast ob prisotnosti monenzina	54
4.2.2	Ohranjanje odpornosti	59

4.2.3	Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin in plinov	60
4.2.4	Analiza dolgoverižnih membranskih maščobnih kislin.....	61
4.2.5	Analiza velikosti celic v prisotnosti in odsotnosti monenzina s presevnim elektronskim mikroskopom.....	63
4.2.6	Odpornost proti antibiotikom	65
4.2.7	Izolacija DNA in analiza genomskeh sekvenc	67
5	RAZPRAVA	71
5.1	HIPOTETIČNI KONJUGATIVNI TRANSPOZON CTnB ₁ 4.....	71
5.2	ODPORNOST BAKTERIJ <i>P. bryantii</i> in <i>P. ruminicola</i> PROTI MONENZINU.....	73
5.2.1	Odpornost divjih tipov proti monenzinu in adaptacija na monenzin	74
5.2.2	Ohranitev odpornosti proti monenzinu.....	76
5.2.3	Profil produktov fermentacije.....	76
5.2.4	Sestava membranskih DMK	77
5.2.5	Velikost celic	78
5.2.6	Odpornost proti antibiotikom	79
5.2.7	Spremembe v genskem zapisu adaptant	81
5.2.8	Narava odpornosti.....	83
6	SKLEPI	85
7	POVZETEK (SUMMARY).....	87
7.1	POVZETEK	87
7.2	SUMMARY	89
8	VIRI.....	92
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Sestava gojišča M2	28
Preglednica 2: Skupina tarčnih genov pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>traG</i>	31
Preglednica 3: Skupina netarčnih genov pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>traG</i>	31
Preglednica 4: ZO za pomnoževanje gena <i>traG</i> v bakteriji <i>P. bryantii</i> B ₁ 4.	31
Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice pri pomnoževanju gena <i>traG</i>	32
Preglednica 6: Razmere pri pomnoževanju gena <i>traG</i>	32
Preglednica 7: Sestava 5 × pufra TBE.....	33
Preglednica 8: Sestava gojišča LB.....	33
Preglednica 9: Razmere pri PCR, s katerim smo preverili prisotnost inserta v kompetentnih celicah.....	34
Preglednica 10: Imena, okrajšave, koncentracije in proizvajalci antibiotikov, ki smo jih v raziskavi uporabili v obliki trakov z gradientom antibiotikov.	40
Preglednica 11: Imena, okrajšave, količine in proizvajalci antibiotikov, ki smo jih v raziskavi uporabili v obliki diskov.	40
Preglednica 12: Primerjava dolžin in vsebnosti GC v genomih, konjugativnih transpozoni in ohranjenih regijah pri bakterijah <i>P. bryantii</i> B ₁ 4, <i>B. fragilis</i> YCH46 in <i>B. uniformis</i> WH207.....	48
Preglednica 13: Delež genov hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB ₁ 4, ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih.	52
Preglednica 14: Primeri genov iz nekaterih drugih bakterij, ki so homologni (I>30 %) regiji za razgradnjo sladkorjev in polisaharidov v CTnB ₁ 4.	53
Preglednica 15: Primerjava odpornosti divjega tipa in adaptant sevov B ₁ 4 in 23 proti antibiotikom iz različnih skupin.	66
Preglednica 16: Število razlik v genomih B ₁ 4, B ₁ 4-150, 23, 23-150 v primerjavi z referenčnima genomoma <i>P. bryantii</i> B ₁ 4 (NZ_ADWO00000000.1) in <i>P. ruminicola</i> 23 (NC_014033.1)	68
Preglednica 17: Anotacija genetskih sprememb, značilnih za adaptanto 23-150 seva <i>P. ruminicola</i> 23.....	69
Preglednica 18: Anotacija genetskih sprememb, značilnih za adaptanto B ₁ 4-150 seva <i>P. bryantii</i> B ₁ 4.	70

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Filogenetsko drevo sekvenc genov za 16S rRNA najbolj pogosto izoliranih skupin bakterij iz človeškega blata.....	5
Slika 2: Mozaična struktura mobilizirajočih in konjugativnih genetskih elementov.....	8
Slika 3: Način prenosa konjugativnega transpozona in prenosa drugih elementov, ki ga lahko posredujejo konjugativni transpozoni.....	11
Slika 4: Shematski prikaz petih družin konjugativnih transpozonov v bakterijah iz rodu <i>Bacteroides</i>	13
Slika 5: Shema prenosa mobilnih genetskih elementov med bakterijami prebavnega trakta in tistimi, ki prebavni trakt le prehajajo.....	19
Slika 6: A) Kemijska struktura monenzina, B) konformacija ob vezavi kationa.....	22
Slika 7: Idealna (sredina) in še sprejemljiva gostota bakterijske rasti (najmanjša gostota levo in največja gostota desno) na agarnih ploščah pri testiranju odpornosti proti antibiotikom.....	39
Slika 8: Očiščeni pomnožki gena <i>traG</i> v agaroznem gelu, pomnoženi s kombinacijami ZO 1F-2R (1), 2F-3R (2) in 3F-3R (3).....	46
Slika 9: Shematski prikaz lege ohranjenih regij v konjugativnih transpozonih CTnB ₁₄ , CTnBST in CTn3-Bf ter polisaharidne regije seva B ₁₄	48
Slika 10: Homolognost in ohranjenost zaporedja genov regije <i>tra</i> konjugativnih transpozonov CTn3-Bf in CTnB ₁₄ glede na CTnBST.....	49
Slika 11: Homolognost in ohranjenost zaporedja genov regije GG konjugativnih transpozonov CTn3-Bf in CTnB ₁₄ glede na CTnBST.....	50
Slika 12: A) Primerjava aminokislinske podobnosti CTn3-Bf in CTnBST. Primerjava aminokislinske podobnosti B) regije <i>tra</i> in C) regije GG konjugativnih transpozonov CTn3-Bf (svetlo siva) in CTnBST (temno siva) s homolognima regijama v CTnB ₁₄	51
Slika 13: Rast paralelk seva B ₁₄ v gojišču s koncentracijo monenzina 0-140 µM.....	55
Slika 14: Sprememba povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva B ₁₄ v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-1000 µM.....	56
Slika 15: Sprememba povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva <i>P. bryantii</i> TC1-1 v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-1000 µM.....	57
Slika 16: Sprememba povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva <i>P. bryantii</i> TF1-3 v gojišču s koncentracijo monenzina 0-1000 µM.....	57
Slika 17: Povprečna vrednost absorbance ob rasti seva 23 v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-50 µM.....	58
Slika 18: Največja absorbanca monenzinskih adaptant pri gojenju v gojišču M2 brez monenzina (M2 → M2) in adaptant, ki smo jih precepili v gojišče M2 s koncentracijo monenzina 10 µM (B ₁₄ -10, 23-10) ali 150 µM (B ₁₄ -150, 23-150) iz kulture prejšnjega dne, ki je zrasla v gojišču brez monenzina (M2 → M2 + monenzin).....	59
Slika 19: Največja absorbanca monenzinskih adaptant pri gojenju v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 10 µM (B ₁₄ -10, 23-10) ali 150 µM (B ₁₄ -150, 23-150).....	60

Slika 20: Primerjava povprečnih vrednosti deležev analiziranih KMK v divjih tipih in adaptantah sevov 23 ter B ₁ 4..	61
Slika 21: Primerjava povprečnih deležev posameznih DMK v membranah sevov 23 in B ₁ 4 ter njunih adaptant na monenzin.....	62
Slika 22: Povprečne vrednosti deležev nenasičenih, nasičenih razvejanih in nasičenih nerazvejanih DMK v membranah divjih tipov in adaptant sevov 23 in B ₁ 4.....	63
Slika 23: Celice bakterije <i>P. bryantii</i> B ₁ 4 v stacionarni fazи, posnete s presevnim elektronskim mikroskopom.	634
Slika 24: Celice bakterije <i>P. ruminicola</i> 23 v stacionarni fazи, posnete s presevnim elektronskim mikroskopom.	634
Slika 25: Primerjava širine in dolžine celic divjega tipa, zraslih v gojišču brez monenzina, in adaptant seva 23, zraslih v gojišču z monenzinom, v logaritemski (L) in stacionarni (S) fazи rasti.....	65
Slika 26: Primerjava širine in dolžine celic divjega tipa, zraslih v gojišču brez monenzina, in adaptant seva B ₁ 4, zraslih v gojišču z monenzinom, v logaritemski (L) in stacionarni (S) fazи.....	65

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AMC	amoksiciln-klavulanska kislina
AZ	azitromicin
C	kloramfenikol
CEC	cefaklor
CH	klaritromicin
CIP	ciprofloksacin
CM	klindamicin
CPD	cefpodoksim
CXM	cefuroksim
CTn	konjugativni transpozon (ang. conjugative transposon)
CZ	cefazolin
dH ₂ O	destilirana voda
DMK	dolgoverižne maščobne kisline
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (ang. deoxyribonucleotide triphosphate)
E	eritromicin
ENO	enrofloksacin
F/M	nitrofurantoin
FFC	florfenikol
GM	gentamicin
HGT	horizontalni genski prenos (ang. horizontal gene transfer)
IMI	imipenem
IS	insercijska sekvenca
KMK	kratkoverižne maščobne kisline
LCFA	ang. long-chain fatty acid
LE	levofloksacin
MET	metronidazol
MK	maščobne kisline
MUP	mupirocin
NB	novobiocin
NBU	nepodvajajoče se enote v rodu <i>Bacteroides</i> (ang. non-replicating <i>Bacteroides</i> units)
NN	tobramicin
NOR	norfloksacin
ORF	odprt bralni okvir (ang. open reading frame)
OX	oksacilin
P	penicilin
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
PG	benzilpenicilin
SAM	ampicilin-sulbaktam

SCFA ang. short-chain fatty acid
SXT sulfametoksazol-trimetoprim
TE tetraciklin
TZ ceftazidim
VA vankomicin
ZO začetni oligonukleotid

1 UVOD

Bakterije iz rodov *Prevotella* in *Bacteroides* filogenetsko uvrščamo v bakterijsko deblo *Bacteroidetes* in so pomembni predstavniki mikrobne združbe prebavnega trakta človeka in živali. Te ekosisteme naseljuje izjemno število mikroorganizmov, ki igrajo pomembno vlogo pri procesih razgradnje hrane, razvoja imunskega sistema, zaščite pred pritrditvijo patogenih mikroorganizmov, pri odzivih na poškodbe epitelnih celic črevesja, shranjevanja maščob gostitelja in biotransformacij (npr. ksenobiotikov), ki jih gostitelj sam ni sposoben vršiti. V energetskem smislu sta aktivnost in funkcija mikroorganizmov pomembni predvsem v predželodcih rastlinojedih živali, na primer v vampu goveda. Pri razgradnji različnih rastlinskih polisaharidov v vampu goveda so zelo pomembne bakterije iz rodu *Prevotella*, ki predstavljajo tudi do 60 % mikrobne združbe omenjenega ekosistema. Kljub temu, da so zastopane v zelo velikem številu in sodelujejo v mnogih pomembnih procesih, so njihove genetske značilnosti slabo poznane, saj do sedaj izolirani sevi predstavljajo le marginalne podskupine tega rodu v naravi. V debelem črevesu človeka prevotele niso tako množično zastopane, vendar četrtino mikrobne združbe zavzemajo njim sorodne bakterije iz rodu *Bacteroides*. Tudi bakterije tega rodu so saharolitične, nekatere vrste so pomembni oportunistični patogeni. Rodova se razlikujeta od dobro poznanih bakterij (npr. proteobakterij) predvsem po drugačni, a še vedno slabo preučeni genetiki. Preučevanje teh organizmov otežuje pomanjkanje primernih orodij za gensko manipulacijo. Ena od genetskih značilnosti bakterij iz rodu *Bacteroides* so veliki konjugativni transpozoni, ki so v tem rodu pogosti in pomembni pri razširjanju genov za odpornost proti antibiotikom, niso pa še bili opisani v sorodnih bakterijah iz rodu *Prevotella*.

Genska manipulacija vampnih bakterij že nekaj časa zbuja zanimanje, ker bi s spremenjanjem posameznih mikroorganizmov ali z manipulacijo mikrobne združbe lahko dosegli večji izkoristek krme in posledično hitrejšo rast živali. Za to sedaj uporabljajo različne krmne dodatke, npr. antibiotike. Predvsem pri reji prežvekovalcev kot krmne dodatke v ZDA in nekaterih drugih delih razvitega sveta uporablajo ionoforne antibiotike, ki spremenijo mikrobno združbo vampa tako, da le ta pri hidrolizi rastlinskih polisaharidov proizvaja manj stranskih produktov kot je npr. okoljsko škodljivi metan in več kratkoverižnih maščobnih kislin, ki jih gostitelj uporabi za lastno rast in razvoj. Leta 2006 je Evropska unija zaradi strahu pred nekontroliranim pojavom in širjenjem odpornosti proti antibiotikom prepovedala uporabo vseh antibiotikov kot krmnih dodatkov, kar pa je povzročilo rast stroškov reje. V zadnjih letih so se raziskave usmerile v iskanje alternativnih krmnih dodatkov, vendar do sedaj niso odkrili učinkovitih alternativ. Sledеča opažanja budijo dvome o upravičenosti prepovedi uporabe ionofornih antibiotikov in pozivajo k nadaljnemu raziskovanju mehanizma in prenosa odpornosti proti ionofornim antibiotikom: a) za zdravljenje bakterijskih okužb v medicini in veterini ionofornih antibiotikov ne uporabljam, b) do sedaj v vampnih bakterijah ni znanih genetskih elementov, ki bi omogočali odpornost proti ionofornim antibiotikom, c) ni dokazov, da bi

se takšen tip odpornosti lahko prenašal med bakterijami, d) naravno odporne bakterije proti ionoformnim antibiotikom so našli v živalih, ki nikoli niso dobivale ionoformnih antibiotikov, vendar mehanizmi odpornosti še niso znani.

Naš namen je raziskati mehanizem odpornosti proti monenzinu pri vampnih bakterijah *Prevotella bryantii* B₁₄ in *Prevotella ruminicola* 23 s primerjavo fenotipskih, metabolnih in genetskih značilnosti divjih tipov in njunih na monenzin adaptiranih različic. Želeli smo ugotoviti, ali je odpornost genetske narave in ali v tem primeru obstajajo genetski elementi, s katerimi bi se odpornost lahko prenašala med bakterijami.

Glede na to, da nekatere raziskave nakazujejo na obstoj konjugativnega transpozona v bakteriji *P. bryantii* B₁₄, smo domnevali, da nam bo z uporabo modernih molekularno bioloških pristopov uspelo dokazati obstoj omenjenega konjugativnega transpozona v sevu B₁₄.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE IZ RODOV *Prevotella* IN *Bacteroides*

Bakterije iz rodov *Prevotella* in *Bacteroides* spadajo v deblo *Bacteroidetes*, red *Bacteroidales*, prve v družino *Prevotellaceae*, druge pa v družino *Bacteroidaceae*. So simbiotske bakterije, ki naseljujejo prebavni trakt človeka in živali. Prokarioti v takšni simbiozi pridobijo prostor za življenje in stalen vir hrani, evkariontu pa nudijo nove metabolne zmožnosti in zaščito pred kolonizacijo patogenih mikroorganizmov, poleg tega pa vplivajo tudi na razvoj imunskega sistema, sodelujejo pri odzivih na poškodbe epitelnih celic črevesja, vplivajo na energijsko bilanco in shranjevanje maščob gostitelja, stimulirajo nastanek krvnih žil (Eckburg in sod., 2005; Gill in sod., 2006). Debelo črevo z 10^{11} mikrobnih celic/g vsebine velja za najgosteje naseljen mikroben ekosistem, vendar kljub visoki koncentraciji mikroorganizmi v debelem črevesu vsejedih in mesojedih živali ne prispevajo bistveno k izkoriščanju zaužite hrane, saj večji del prebave in vsrkavanja hrani poteka že prej. Mikrobna razgradnja hrane je z energetskega stališča bistveno bolj pomembna v predželodcih rastlinojedih živali, najbolj ekstremna primera prilagoditve sta skupini prežvekovcev in termitov. Za obe skupini živali sta mikroben združbi, ki razgrajujeta rastlinske polisaharide oziroma lignocelulozo v njuni prehrani, esencialnega pomena. Med gostiteljem in mikroben združbo se je vzpostavila zapletena mreža interakcij, ki vzdržuje homeostazo v prebavnem traktu. Predvsem v humani medicini bi razumevanje interakcij in vpliva različnih dejavnikov nanje lahko pomembno prispevalo k preprečevanju in zdravljenju bolezni, ki nastanejo zaradi porušenega ravnovesja med gostiteljem in mikroben združbo (Neish, 2009).

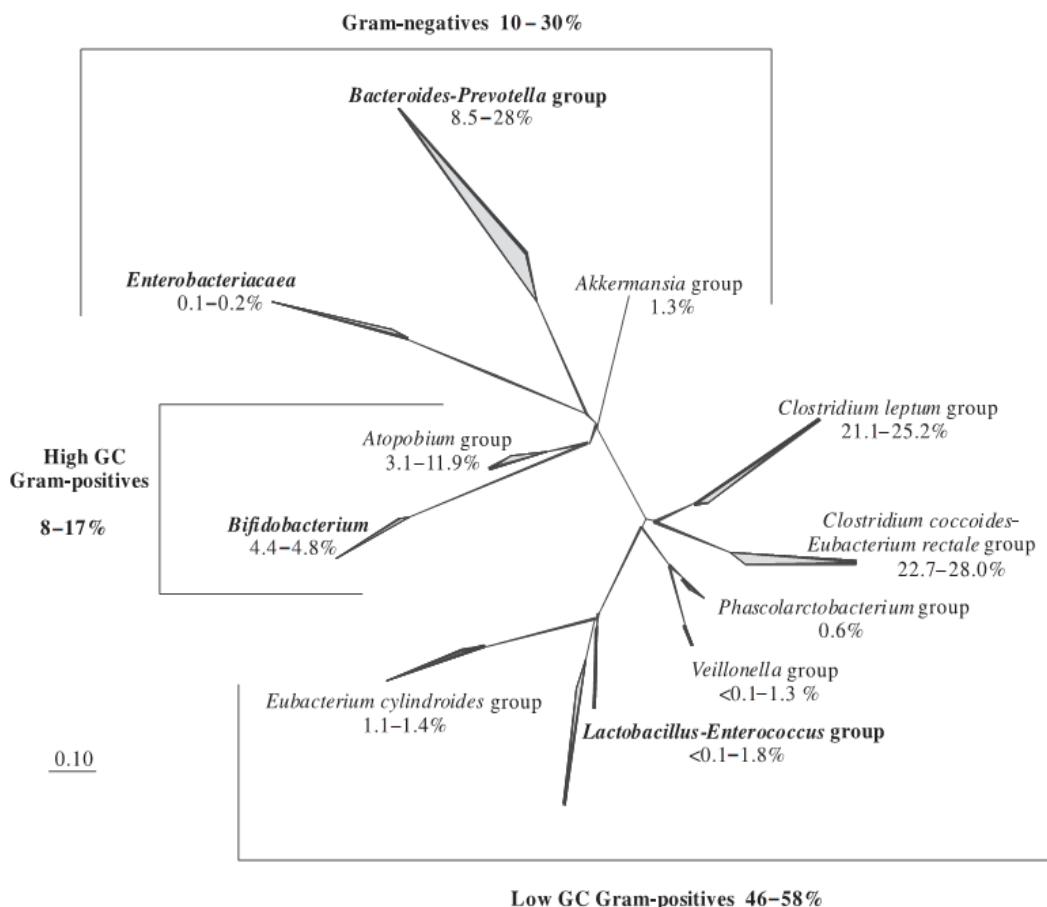
Rod *Prevotella* združuje po Gramu negativne, striktno anaerobne in zmerno saharolitične bakterije. Glede na habitat jih razdelimo v dve skupini, ki sta tudi filogenetsko različni. Prvo skupino sestavljajo vrste iz vampa prežvekovcev, drugo pa vrste iz ustne votline in genitalnih predelov (Avguštin in sod., 2001). V vampu so prevotele ene najštevilčnejših bakterij, ocene deleža prevotel v bakterijski združbi vampa, ugotovljene s klasičnimi in molekularnimi pristopi pa so različne, največkrat se gibljejo od 30 do 60 %. Najbolje preučene vrste prevotel (*P. bryantii*, *P. ruminicola* in *P. brevis*) (Avguštin in sod., 1994; Avguštin in sod., 1997) predstavljajo le majhen delež bakterijske združbe, kar kaže na obstoj velikega števila še neodkritih vrst prevotel (Edwards in sod., 2004; Ramšak in sod., 2000; Reilly in sod., 2002; Stevenson in Weimer, 2007; Wood in sod., 1998).

Poleg prevotel se v vampu pojavljajo predvsem po Gramu pozitivne bakterije z nizkim deležem GC iz debla *Firmicutes*. Bakterije iz debel *Chlamydiales-Verrucomicrobia*, *Fibrobacter*, *Spirochaetes*, *Proteobacteria* ter po Gramu pozitivne bakterije z visokim deležem GC so prisotne v manjši meri. Poleg bakterij so v vampu prisotne tudi praživali in anaerobne glive. Združba mikroorganizmov v vampu je odvisna od starosti živali, letnega

časa, sestave krme ter uporabe antibiotikov in drugih antimikrobnih snovi (Edwards in sod., 2004). Pomembna je predvsem za razgradnjo rastlinskih polisaharidov, ki jih gostitelj ne more razgraditi sam (Krause in sod., 2003). Bakterije rodu *Prevotella* so bolj kot pri razgradnji celuloze pomembne pri razgradnji hemiceluloze, ksilana, pektina, škroba ter proteinov. Kljub pomembnemu prispevku prevotel k razgradnji rastlinskih polisaharidov, pa je malo znanega o molekularnih mehanizmih tega procesa. Pri razgradnji rastlinskih polisaharidov nastanejo kratkoverižne maščobne kisline kot so ocetna, propionska, maslena kislina, plini (H_2 , CO_2) in vitamini. Kratkoverižne maščobne kisline gostitelj privzame skozi steno prebavil, služijo mu kot vir energije. Kopičenje vodika, ki je eden izmed končnih produktov fermentacije, lahko zavira nadaljnjo razgradnjo polisaharidov. Vodik v glavnem porabijo metanogene arheje v procesu metanogeneze, sulfatna redukcija in homoacetogeneza sta redkejši (Bäckhed in sod., 2005). Mikroorganizmi vampa so odgovorni tudi za skoraj vso razgradnjo proteinov, ki tam poteče (Reilly in sod., 2002), sami pa so ob lizi mikrobnih celic v siriščniku pomemben vir proteinov za gostitelja, saj krma z njimi ni bogata.

Genetika prevotel je slabo preučena, informacije o njihovih genomih se hitreje kopičijo šele s sekvenciranjem genomov njihovih vrst. Zaradi velikega števila prevotel v vampu in njihove tolerance na nižji pH so se zdele primerne kot modelni organizmi za genetsko manipulacijo, vendar je napredek na tem področju zaustavilo prav pomanjkanje znanja o njihovi genetiki. Problematičen je bil razvoj ustreznih sistemov za prenos genov zaradi majhnega števila znanih plazmidov, ki bi jih uporabili kot vektorje za prenos genov (Flint in Stewart, 1987; Ogata in sod., 1996), zaradi relativno velike genetske raznolikosti (Accetto in Avguštin, 2011; Peterka, 2002) in domnevne restriktivne bariere ob vnosu DNA v celico (Accetto in Avguštin, 2007; Accetto in sod., 2005). Prvi uspešen način za direkten vnos genov v prevotele so opisali leta 2005 in temelji na zaščiti vnesene DNA s celičnim ekstraktom pred elektroporacijo (Accetto in sod., 2005). V že sekvenciranih genomih prevotel in sorodnikov iz rodu *Bacteroides* pa je razvidno, da imajo ti organizmi zelo veliko število genov za razgradnjo polisaharidov (Bäckhed in sod., 2005). Najbolj obsežen »glikobiom« ima bakterija *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bäckhed in sod., 2005), ki ima kar 257 genov za glikozidne hidrolaze in 16 genov za polisaharidne liaze.

Rod *Bacteroides* sestavlja anaerobne, po Gramu negativne saharolitične bakterije, ki proizvajajo ocetno in jantarno kislino kot glavna končna metabolna produkta (Salyers in sod., 2007a) ter naseljujejo pretežno debelo črevo človeka in živali. Tu so se vzpostavile razmere, ki omogočajo nastanek najgosteje naseljenega ekosistema, saj se hrana v tem delu zadržuje dlje časa kot v drugih predelih prebavnega trakta, pH pa doseže nevtralno območje. Kisika je zelo malo ($E_h = -200$ do -300mV), zato prevladujejo obligatno anaerobni mikroorganizmi, fakultativnih anaerobov ni veliko.



Slika 1: Filogenetsko drevo sekvenc genov za 16S rRNA najbolj pogosto izoliranih skupin bakterij iz človeškega blata. Merilo predstavlja izračunano razdaljo med sekvencami (Zoetendal in sod., 2006).

Figure 1: Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences representing different groups of bacteria which are most frequently detected in human faeces. The scale bar represents the calculated distance between the sequences (Zoetendal et al., 2006).

Iz dosedanjih raziskav lahko povzamemo, da je precej vrst bakterijske združbe zadnjega dela prebavil človeka še neznanih, glavnino pa sestavljajo bakterije iz debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes* (Eckburg in sod., 2005; Gill in sod., 2006; Hayashi in sod., 2006; Kurokawa in sod., 2007; Salyers in sod., 2007a; Saunier, 2005; Tap in sod., 2009; The human microbiome project, 2012; Zoetendal in sod., 2006). Vrste iz rodu *Bacteroides* predstavljajo približno 25 % mikrobne populacije v črevesju človeka. Ostale tri četrtnine pripadajo po Gramu pozitivnim anaerobnim bakterijam, od katerih jih veliko spada v rod *Clostridium* (slika 1) (Salyers in sod., 2007a; Zoetendal in sod., 2006). Pomembni člani teh so bakterije, ki tvorijo masleno kislino in skrbijo za vzdrževanje in zaščito epitela pred pritrdirtvijo in vdorom patogenih bakterij. Dobro preučeni fakultativni anaerobi kot je *E. coli* predstavljajo manj kot 1 % mikrobne združbe, saj so razmere v črevesju močno anaerobne (Eckburg in sod., 2005; Salyers in sod., 2007a). Arhejska združba črevesa je manj peстра kot bakterijska, ki sicer pripada le dvema debloma, vendar je zelo raznolika na

vrstnem nivoju (Eckburg in sod., 2005; Gill in sod., 2006). Združba virusov naj bi obsegala približno 1200 virusnih genotipov, največ sekvenc v tej zbirki je podobnih fagom po Gramu pozitivnih bakterij, kar je skladno s trditvijo, da je skupina po Gramu pozitivnih bakterij v črevesju najbolj zastopana (Zoetendal in sod., 2006).

Tako bakterije iz rodu *Bacteroides* kot *Prevotella* se razlikujejo od dobro poznanih po Gramu negativnih bakterij (npr. proteobakterij) predvsem po drugačni, a še vedno slabo preučeni genetiki. Od njih se razlikujejo po promotorskih sekvencah, odsotnosti Shine-Dalgarnovega zaporedja (Accetto in Avguštin, 2011), skoraj popolni odsotnosti plazmidov in prisotnosti velikih konjugativnih transpozonov. Veliki konjugativni transpozoni so sposobni tudi mobilizacije drugih elementov kot so plazmidi in mobilizirajoči transpozoni, kar jim daje velik pomen v ekologiji in evoluciji bakterij. Zelo pogosti so pri bakterijah iz rodu *Bacteroides*, kjer so odgovorni za širjenje odpornosti proti antibiotikom, pri prevotelah pa doslej še ni opisanega konjugativnega transpozona (Salyers in sod., 1995a, 1995b).

2.2 HORIZONTALNI GENSKI PRENOS IN MOBILNI GENETSKI ELEMENTI

Bakterijski genomi so mozaiki genov, iz katerih je razvidno, da so se geni premeščali znotraj genoma kot tudi med genomi različnih bakterij. Bakterijsko pestrost lahko pojasnita dva mehanizma (Dutta in Pan, 2002):

- Spremembe genetskega materiala v celici, ki so posledica podvojitve, mutacij ter homologne rekombinacije. Prenašajo se z vertikalnim prenosom, t.j. z delitvijo na novo nastale celice. Podvojitve genov in točkaste mutacije zagotavljajo neprekinjeno, a počasno spremicanje genoma, kar lahko privede do procesa diverzifikacije in nastanka novih vrst mikroorganizmov. S tem omenjeni mehanizmi mikroorganizmom omogočijo postopno zasedanje novih okoljskih niš.
- Privzem genov s horizontalnim (lateralnim) prenosom. Prenos genetske informacije med celicami zagotavlja večje, nenadne spremembe v strukturi ter organizaciji genoma in s tem omogoča nastanek novih bakterijskih sevov (Dutta in Pan, 2002). Horizontalni genski prenos (HGT, angl. horizontal gene transfer) je pomemben za zagotavljanje genetske raznolikosti pri prokariontih in bi lahko nadomeščal odsotnost rekombinacije, ki je prisotna pri spolnem razmnoževanju evkariontov, saj sta izmenjava genetskega materiala in razmnoževanje pri prokariontih neodvisna procesa.

Verjetnost, da spremicanje obstoječih genov doprinese k nastanku novih ekotipov, se veča z manjšanjem števila mutacij, ki so potrebne za neko prilagoditev. Včasih stanja, ki bi nudilo prilagoditev, ni mogoče doseči, ker je vmesni evolucijski korak lahko za organizem poguben, npr. ko je za prilagoditev potrebnih več manjših mutacij (Cohan in Koeppel, 2008). Točkovne mutacije lahko spremenijo obstoječe metabolne funkcije, HGT pa prinese

nove metabolne in fiziološke lastnosti kot so odpornost proti antibiotikom ter virulentnost (Dutta in Pan, 2002).

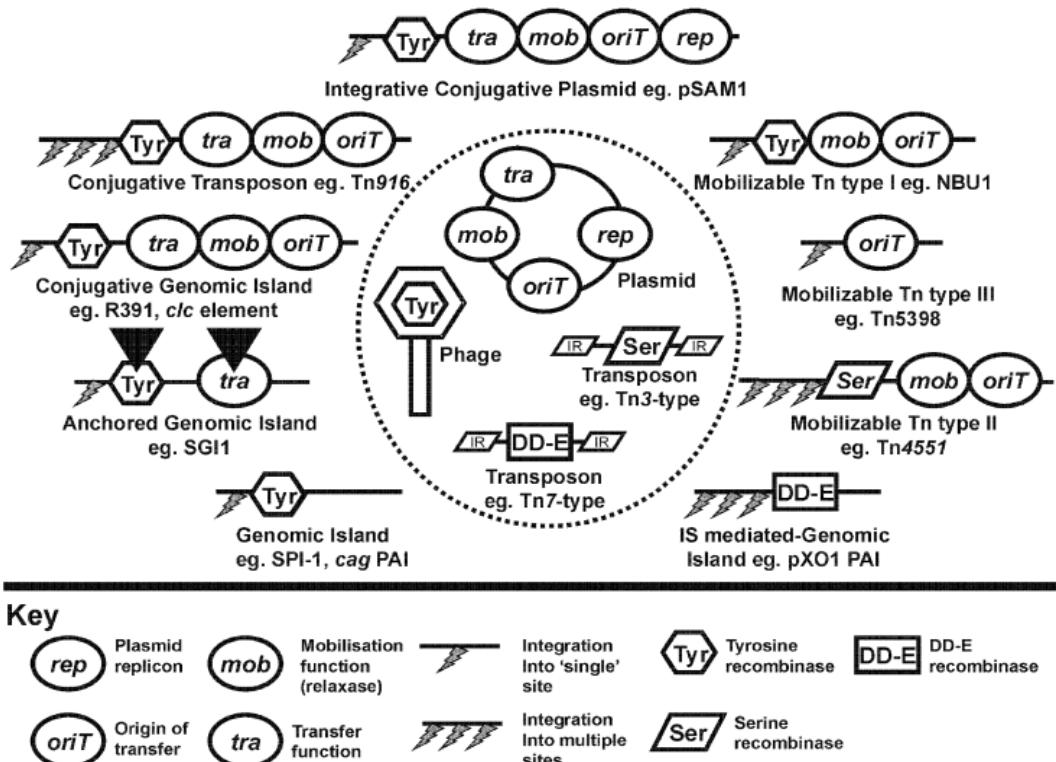
Genomske analize kažejo, da sta HGT in izguba genov glavna mehanizma evolucije, ki vključuje večino prokariotskih genov. HGT vpliva na 2-60 % prokariotskih genov (Lal in sod., 2008), po nekaterih podatkih celo na 96 % genov (Treangen in Rocha, 2011). Prokarionti se prilagajajo na nova okolja in nove načine preživljjanja s privzemanjem genov drugih vrst, ki nudijo že obstoječe in uveljavljene lastnosti. Če bi se mikroorganizmi prilagajali le s privzemanjem novih genov, bi bili njihovi genomi vedno večji. Na ekološko nišo, ki jo organizem zasede, tako vpliva optimizacija med izgubo manj pomembnih genov in ohranjanjem koristnih genov, privzetih s HGT (Dutta in Pan, 2002).

2.2.1 Mobilni genetski elementi in način prenosa

Geni se običajno ne prenašajo posamično, ampak v skupinah, ki jih imenujemo mobilni elementi. Ti lahko predstavljajo znaten delež genoma in imajo pogosto mozaično strukturo (slika 2). V preteklosti so se pojavila različna poimenovanja in oznake mobilnih elementov (Osborn in Böltner, 2002).

Poznamo mobilne elemente, ki se premeščajo znotraj genomov bakterij, in sicer s transpozicijo, t.j. z izrezom in premestitvijo ali pa podvojitvijo na drugo mesto v genomu. S prenosom na novo mesto lahko preprečijo izražanje določenega gena ali skupine genov. Izjemoma se lahko ti elementi prenašajo med celicami s pomočjo bakteriofagov, transformacijo DNA propadle celice ali vključitvijo v konjugativne mobilne elemente. Najbolj enostavni in najmanjši bakterijski mobilni elementi (700-1500 bp) so insercijske sekvence (IS). Osrednji del insercijske sekvence zaseda gen za transpozazo - encim, ki je odgovoren za prenos elementa, na koncih pa so 10-40 bp dolge obrnjene ponovitve. Podobni IS, a večji (~5 kbp) so enostavni transpozoni, katerih osrednji del je sestavljen iz več genov. Sestavljeni transpozoni pa so veliki 5-10 kbp in običajno imajo gene za odpornost proti antibiotikom. Na koncih sta IS, ki sta lahko obrnjeni v isto ali nasprotno smer. Obe IS se premikata z vmesno DNA kot enoten element, čeprav običajno le ena skrbi za premeščanje transpozona (Hartl, 2014).

Za prenos genetske informacije so pomembnejši mobilni elementi, ki se prenašajo med bakterijskimi celicami s transformacijo, transdukcijo ali konjugacijo. Transformacija je privzem proste plazmidne ali fragmentirane kromosomske DNA iz okolja, ki se sprosti zaradi aktivnega izločanja ali razpada celice. DNA se med celicami lahko prenaša tudi z vektorji, in sicer z virusi ter različnimi mobilnimi genetskimi elementi v procesu konjugacije (Norman in sod., 2009). Pri prenosu mobilnih genetskih elementov, ki pogosto kodirajo za bakterije koristne gene, govorimo o konjugaciji. Takšni konjugativni elementi so plazmidi, genomski otoki, konjugativni in mobilizirajoči transpozoni.



Slika 2: Mozaična struktura mobilizirajočih in konjugativnih genetskih elementov. Mobilni genetski elementi, ki prispevajo glavne funkcionalne komponente, so prikazani znotraj črtane črte. Črni trikotniki v komponentah mirujočega genomskega otoka (angl.: anchored genomic island) nakazujejo, da obstajajo ostanki komponent ali oblike takšnih komponent, v katerih so se zgodile mutacije (Osborn in Böltner, 2002). Figure 2: The mosaic continuum of mobilizable and conjugative genetic elements. MGE (plasmids, phage, and transposons) that contribute key functional components are circled (dotted lines). MGE functional modules are as given in the key. Black triangles inserted within the functional modules of the Anchored Genomic Island indicate that molecular evidence exists for remnants or mutant forms of such modules (Osborn and Böltner, 2002).

Plazmidi so običajno krožne, dvoverižne, supernavite enote DNA v bakterijah, ki se podvajajo ločeno od kromosomske DNA. Redkeje so linearne oblike, kot npr. v bakterijah iz rodov *Borrelia* in *Streptomyces*. So različnih velikosti, merijo od manj kot 5 do nekaj sto kbp, poznani pa so tudi plazmidi, veliki do 2 Mbp. Poleg konjugativnih poznamo tudi nekonjugativne plazmide, ki ne kodirajo genov, potrebnih za prenos v drugo celico. Veliki plazmidi (>40 kbp) so običajno konjugativni in se v celici ohranajo le v nekaj kopijah. Imajo gene potrebne za podvojevanje in se ob delitvi celice razporedijo v novonastali celici podobno kot bakterijski kromosom. Plazmidi manjši od 7,5 kbp pa so običajno nekonjugativni in v celici nastopajo v velikem številu kopij (največkrat 10-20). Za podvojevanje potrebujejo pomoč gostitelja in se ob delitvi gostiteljske celice naključno porazdelijo v novonastali celici (Holmes in Jobling, 1996).

V plazmidih so pogosto odkrili gene za odpornost proti antibiotikom in toksine ali adhezine. Primere takih plazmidov najdemo v bakterijah *Escherichia coli* (temperaturno občutljiv in temperaturno odporen enterotoksin), *Staphylococcus aureus* (eksfoliativni toksin), *Clostridium tetani* (tetanus toksin), *Bacillus anthracis* (kompleks antraks toksina, kapsula). Nekateri plazmidi ne kodirajo produktov, ki bi gostiteljski celici omogočili boljšo prilagoditev na okolje in jih imenujemo kriptični plazmidi (Holmes in Jobling, 1996).

Genomski otoki so po velikosti in zgradbi zelo podobni konjugativnim transpozonom. Ključna razlika je ta, da se konjugativni transpozoni v kromosom vstavijo naključno, genomske otoki pa se vstavijo le v eno do dve mesti v bližini genov za tRNA ali vanje. Obe vrsti elementov se lahko vključita tudi v plazmide. Genomske otoke obdajajo direktne ponovitve, ki so podobne mestom za vključitev fagnih nukleinskih kislin. Imajo zapis za integrizo, ki je sorodna integrazi bakteriofaga λ in spada v družino tirozinskih rekombinaz. V primeru odsotnosti proteina za izrez lahko genomske otoke izrežejo in spodbudijo tvorbo krožnega intermediata določeni bakteriofagi. Za nekatere genomske otoke ni jasno, ali so sposobni samoprenosa, vendar jim prisotnost *tra* genov, ki so podobni plazmidnim, omogoča mobilizacijo s konjugacijo, ki jo posredujejo drugi mobilni elementi (Osborn in Böltner, 2002).

Genomski otoki kodirajo različne gene, ki bakterijam omogočajo prilagoditev spremembam v okolju in zasedanje novih ekoloških niš. Zaradi tega se je pojavilo več različnih poimenovanj, ki odražajo podskupine genomskega otoka: ekološki, fitnes, simbiontski otoki ter otoki patogenosti. Geni v genomskih otokih kodirajo adhezine, sekrecijske sisteme, sisteme za privzem železa, toksine, pa tudi gene za odpornost proti antibiotikom in težkim kovinam, razgradnjo ksenobiotikov in gene, ki omogočajo simbiozo. Prvi genomski otok je bil odkrit v *E. coli*, kasneje so otoke patogenosti našli v širokem spektru po Gramu pozitivnih (*Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium*) in po Gramu negativnih (*Yersinia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Neisseria*) patogenih bakterij (Osborn in Böltner, 2002).

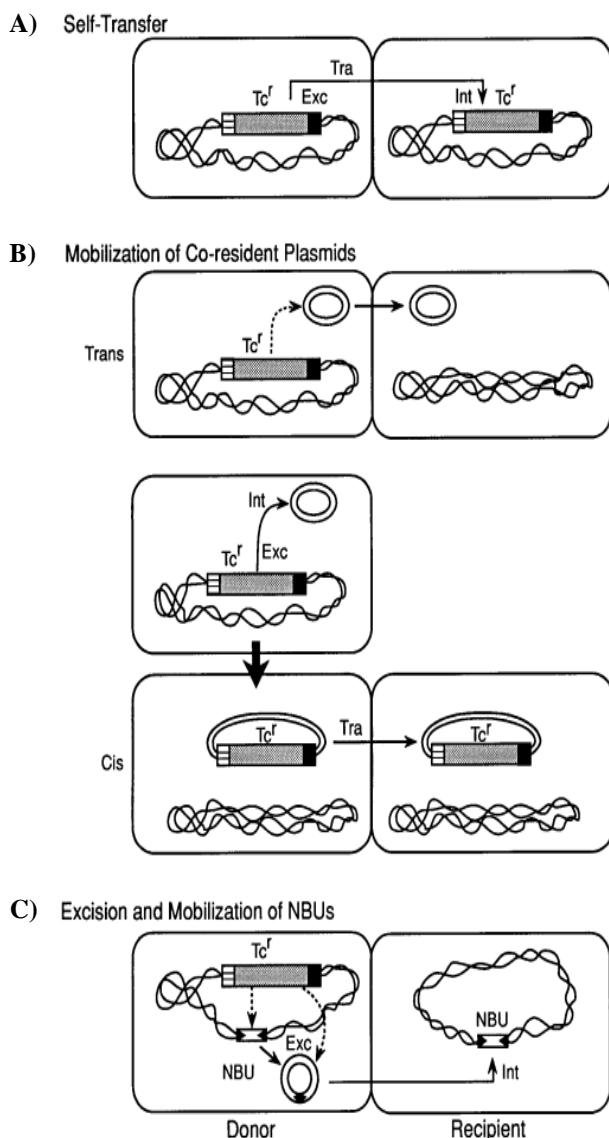
Konjugativni transpozoni so 18-560 kbp veliki elementi (najpogosteje 50-80 kbp), ki se vključijo v kromosom ali plazmid in lahko predstavljajo znaten delež bakterijske DNA. Med seboj se ne izključujejo tako kot nekateri bakteriofagi in plazmidi, zato je v eni bakterijski celici lahko več različnih ali enakih konjugativnih transpozonov (Salyers in sod., 2004b).

Prve konjugativne transpozone so odkrili in opisali pred približno 25 leti, ker so vsebovali gene za odpornost proti antibiotikom. Odkrili so jih v več bakterijskih rodovih, npr. *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Salmonella* (Whittle in sod., 2001; Salyers in sod., 1995a). Imajo različne gene, ki bakterijam nudijo boljšo prilagoditev razmeram v okolju, npr. virulenčne gene, gene za izrabo novih substratov ali za DNA

restriktijsko-modifikacijske sisteme. Na konjugativnih transpozoni se pogosteje pojavljajo geni za odpornost proti antibiotikom, ki delujejo tako, da zaščitijo ribosome pred vezavo antibiotika (npr. *tetM*, *tetQ*, geni za odpornost proti eritromicinu tipa MLS), medtem ko gene za odpornost proti β -laktamskim antibiotikom (penicilin, ampicilin), ki običajno hidrolizirajo β -laktamski obroč, pogosteje najdemo na plazmidih (Salyers in sod., 2004b).

Prenos konjugativnih transpozonov poteka tako, da se izrežejo iz kromosoma gostitelja, prenesejo s konjugacijo v drugo celico in vključijo v kromosom prejemnika. Za prenos elementa so pomembni integraza, izrezovalni protein, proteini prenašalnega kompleksa in relaksosoma. Vključitev in izrez konjugativnega transpozona sta neodvisna od homologne rekombinacije. Integrale skoraj vseh konjugativnih transpozonov (razen transpozonov iz klostridijev) spadajo v družino lambdoidnih fagnih integras, ki so podskupina tirozinskih integras. Konjugativni transpozoni iz klostridijev pa imajo rekombinazni/resolvazni tip integrase, ki je podoben družini Tn3 serinskih integras. Poimenovanje tirozinske in serinske integrase se nanaša na aktivno aminokislino na C-terminalnem delu proteina, ki je ključen za vključitev in izrez elementa. Pri izrezu konjugativnega transpozona encim cepi DNA nekaj baznih parov stran od pravih koncev elementa, zato konjugativni transpozoni pridobi kratke dele DNA, t.i. »coupling sequences« (angl.). Ker te sekvene niso komplementarne, prehodno nastane mesto heterolognosti. Tako mesto popravijo popravljalni encimi ali pa se razreši ob podvojitvi, ko se podvoji le eno od pridobljenih kratkih zaporedij. Posledica je, da se vsako končno zaporedje pojavi pri približno polovici krožnih intermediarov (Salyers in sod., 2004b). Kovalentno zaprt krožni intermediat in *oriT*, ki omogočata prenos s konjugacijo, sta sicer značilna za plazmide. Prav tako se pri prenosu obeh vrst elementov prenese enoverižna DNA. Tako plazmidov kot konjugativni transpozoni imajo širok krog prejemnikov in prispevajo k širjenju genov za odpornost proti antibiotikom (Salyers in sod., 1995b). Regija *tra* je pri konjugativnih transpozonih krajša kot pri plazmidih, verjetno zaradi odsotnosti pilov, ki sicer pri plazmidih zavzamejo približno polovico regije *tra*. Večina konjugativnih transpozonov se v kromosom vključi povsem naključno, poznanih pa je nekaj elementov, za katere to ne velja. Predlagali so, da bi jih uvrstili v samostojno skupino in ne h konjugativnim transpozonom (Salyers in sod., 2004b), Osborn in Böltner (2002) sta jih uvrstila v skupino genomskeh otokov.

Konjugativni transpozoni niso odgovorni le za prenos lastnih genov. Z njihovo pomočjo se lahko v druge bakterijske celice prenesejo »in trans« tudi plazmidi in mobilizirajoči transpozoni (slika 3). V tem primeru konjugativni transpozon zagotovi proteine za nastanek proteinskega mostu, mobilizirajoči transpozon ali plazmid pa encime, ki režejo na mestu *oriT* in pričnejo prenos. Pri prenosu mobilizirajočih transpozonov sprožijo tudi njihov izrez iz kromosoma in tvorbo krožnega intermediata. Če konjugativni transpozon prenese plazmid »in cis«, to pomeni da se vanj vgradi in zagotovi vse proteine, potrebne za prenos (Salyers in sod., 1995a).



Slika 3: Način prenosa konjugativnega transpozona in prenosa drugih elementov, ki ga lahko posredujejo konjugativni transpozoni. A) Prenos samega konjugativnega transpozona, B) Prenos plazmida »in trans« ter »in cis«, C) Prenos mobilizirajočega transpozona. Prekinjene puščice ponazarjajo aktivnost proteinov konjugativnega transpozona. Exc = izrez iz kromosoma donorja, Tra = prenos v drugo celico, Int = vgraditev v kromosom prejemnika (Salyers in sod., 1995a).

Figure 3: Transfer of conjugative transposon and elements they can mobilize. A) The transfer of the conjugative transposon itself, B) Mobilization of plasmid in trans and in cis. C) Mobilization of NBUs. The dashed lines indicate proteins provided by the conjugative transposon. Exc = excision from the donor, Tra = transfer into a recipient, Int = integration into the recipient's genome (Salyers et al., 1995a).

Mobilizirajoči transpozoni so elementi, ki se vključijo v kromosom, vendar je njihov prenos v drugo celico odvisen od konjugativnih transpozonov. Običajno so manjši od 15 kbp in niso le okrnjena različica delujočih konjugativnih transpozonov. Njihova sekvenca DNA je drugačna, razlikujejo se tudi v mehanizmih izreza in vključitve v kromosom

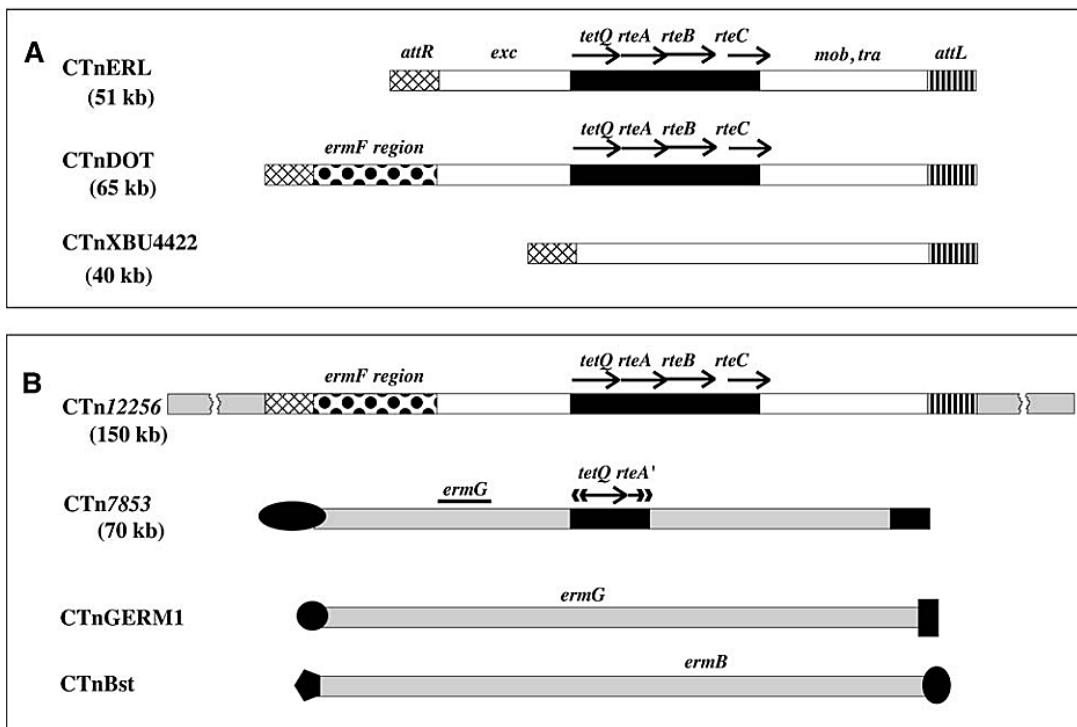
(Salyers in sod., 2004b). Kodirajo do dva proteina, potrebna za mobilizacijo, *oriT* in proteine relaksosoma, ki naredijo zarezo na mestu *oriT* pred začetkom prenosa. Redko imajo gene za odpornost proti antibiotikom. Kot konjugativni transpozoni tvorijo krožni intermediat, njihova integraz spada v družino lambda integraz (Whittle in Salyers, 2002).

Do sedaj so jih odkrili v rodovih *Bacteroides* in *Clostridium*, vendar je malo verjetno, da bi bil ta pojav omejen le na dva rodovala anaerobnih bakterij. V zadnjem času so veliko mobilizirajočih transpozonov odkrili v bakterijah *Clostridium perfringens* in *Clostridium difficile*. Ti elementi imajo gene za odpornost proti antibiotikom in veliko serinsko integrazo iz družine Tn3 transpozaz, tako kot konjugativni transpozoni bakterij iz rodu *Clostridium* (Salyers in sod., 2004b).

2.2.1.1 Konjugativni elementi bakterij iz rodu *Bacteroides*

V bakterijah iz rodu *Bacteroides* sta dve vrsti konjugativnih elementov, plazmidi in transpozoni, vendar so za razširjanje genov za odpornost proti antibiotikom odgovorni predvsem konjugativni transpozoni (Salyers in sod., 1995a). Do sedaj je odkritih več vrst konjugativnih transpozonov, ki so razporejeni v družine, shematsko prikazane na sliki 4 (Whittle in sod., 2002). Konjugativni transpozoni iz posamezne družine imajo določene skupne lastnosti, čeprav vse lastnosti niso nujno skupne vsem CTn zaradi njihove mozaične strukture. Največkrat so to enaki konci CTn in prisotnost gena za odpornost proti antibiotiku, čeprav so večkrat odkrili tudi podobne ali enake CTn brez gena za odpornost (Gupta in sod., 2003; Shoemaker in sod., 2001; Wang in sod., 2003).

V bakterijah iz rodu *Bacteroides* so najpogosteji CTn iz družine CTnDOT. Elementi tipa CTnERL in CTnDOT imajo gen *tetQ*, katerega produkt z vezavo na ribosomske podenote 30S spremeni njeno konformacijo in s tem prepreči vezavo tetraciklina. Poleg tega imajo značilno regulatorno regijo z geni *rte*, ki omogoča pogosteji prenos elementov ob prisotnosti tetraciklina. To je tudi vzrok, zakaj je uporaba tetraciklina v zdravstvu pripomogla k širjenju odpornosti proti temu antibiotiku v bakterijah iz rodu *Bacteroides*. V raziskavi, ki je zajemala 289 sevov iz več kot 10 vrst rodu *Bacteroides*, so odkrili, da ima kar 80 % novejših sevov gen *tetQ*, medtem ko je pred letom 1970 gen *tetQ* imelo le 20-30 % izolatov. V 80 % sevov bakteroidov so odkrili CTnDOT, v 68 % pa kar obo omenjena konjugativna transpozona (Salyers in sod., 1995a; Shoemaker in sod., 2001).



Slika 4: Shematski prikaz petih družin konjugativnih transpozonov v bakterijah iz rodu *Bacteroides*. A) Predstavniki družine CTnDOT imajo enake konce (*attR* in *attL*) in homologne gene za izrez (*exc*), prenos (*tra*) in mobilizacijo (*mob*). Večina elementov ima regulatororno regijo (*rteA*, *rteB*, *rteC*) z genom *tetQ*, ki je odgovorna za pogostejši prenos CTn ob prisotnosti tetraciklina. CTnDOT je identičen CTnERL, le da ima regijo z genom *ermF*. B) Konjugativni transpozoni, ki ne spadajo v družino CTnDOT in si med seboj niso podobni. CTn12256 je nastal z vstavljivo CTnDOT v drug CTn, vendar njegov prenos ni ovisen od tetraciklina. CTn7853 ima gen *tetQ* in nepopoln gen *rteA*, vendar je to edina podobnost z elementi iz družine CTnDOT. Gen za odpornost proti eritromicinu imata tudi CTnGERM1 in CTnBst, vendar nista podobna CTn7853 (Whittle in sod., 2002).

Figure 4: Schematic representation of five families of *Bacteroides* conjugative transposons. A) Elements from CTnDOT family of conjugative transposons have the same end sequences (*attR* and *attL*) and homologous genes for excision (*exc*), transfer (*tra*) and mobilisation (*mob*). In most cases CTns contain regulatory region (*rteA*, *rteB*, *rteC*) with *tetQ* that mediates the tetracyclin induction of excision and transfer. CTnERL and CTnDOT are almost identical, except that CTnDOT contains *ermF* region, which confers resistance to macrolides. B) Elements that do not belong to the CTnDOT family and are not related to each other. CTn12256 is a hybrid element composed of CTnDOT inserted in a CTn, not related to CTnDOT. CTn7853 contains *tetQ* and truncated *rteA* gene, but there is no other similarity to CTns from CTnDOT family. CTn7853, CTnGERM1 and CTnBst all contain the gene conferring macrolide resistance, but they do not appear to be related to each other (Whittle et al., 2002).

CTnDOT ima poleg gena *tetQ* tudi gen *ermF*, ki nudi odpornost proti eritromicinu (Whittle in sod., 2001). Za odpornost bakterij iz rodu *Bacteroides* proti eritromicinu sta odgovorna tudi gena *ermB* (Gupta in sod., 2003) in *ermG* (Wang in sod., 2003), ki prav tako ležita na konjugativnih transpozoni, vendar CTn ne pripadata družini CTnDOT. Oba gena sta prisotna v izolatih iz devetdesetih let, ne pa v starejših izolatih, iz česar raziskovalci

sklepajo, da bi se lahko prenesla v rod *Bacteroides* ne dolgo nazaj (Shoemaker in sod., 2001). Zaradi velike podobnosti genov *ermB* in *ermG*, ki so prisotni v bakterijah iz rodu *Bacteroides* in v po Gramu pozitivnih bakterijah, se pojavlja vprašanje ali je možen prenos konjugativnih transpozonov med tako filogenetsko oddaljenima skupinama bakterij, kot so npr. bakterije iz rodu *Bacteroides* in po Gramu pozitivne bakterije (Gupta in sod., 2003).

Kot je bilo že omenjeno, lahko konjugativni transpozoni omogočijo prenos tudi drugim elementom, npr. plazmidom ali mobilizirajočim transpozonom. Zadnji so v bakterijah iz rodu *Bacteroides* zelo razširjeni. Do sedaj odkriti elementi so veliki 4,7-12 kb in le dva izmed njih imata gen za odpornost proti antibiotiku. Element NBU2 ima gen za odpornost proti eritromicinu in linkomicinu, MTn4555 pa gen za odpornost proti cefoksitinu, ki je sicer pomemben antibiotik za zdravljenje okužb z bakterijami iz rodu *Bacteroides* (Whittle in sod., 2002).

2.2.1.2 Konjugativni elementi bakterij iz rodu *Prevotella*

O konjugativnih prenosih genov pri bakterijah iz rodu *Prevotella* in njihovi genetiki je zelo malo znanega. Prisotnost genov za odpornost proti antibiotikom so v tem rodu raziskali Arzese in sodelavci (2000). V prevotelah so odkrili enake gene *tetQ* kot pri bakterijah iz rodu *Bacteroides*, kar kaže na to, da je med rodovoma prišlo do horizontalnega prenosa genov. Gen *tetQ* se pojavlja v 20 % sevov prevotel, izoliranih iz ustne votline, črevesa in nožnice. V manjšem deležu sevov sta bila prisotna tudi gena za odpornost proti eritromicinu (*ermF*) in penicilinu G. Gen *tetQ* se najpogosteje nahaja na kromosому, čeprav ga najdemo tudi na plazmidih. Kljub temu, da so geni *tetQ* v prevotelah zelo podobni ali celo enaki genom na konjugativnih transpozonih bakteroidov (npr. na plazmidu pRRI4 in CTnDOT), pa podobnosti s preostalimi deli konjugativnih transpozonov (CTnDOT, CTn7853) niso našli. Če se *tetQ* med bakterijami iz rodu *Prevotella* prenaša s konjugativnimi transpozoni, so torej drugačni kot jih poznamo pri bakteroidih (Nikolich in sod., 1994a). Elementi prevotel, na katerih so do sedaj odkrili gen *tetQ*, so veliki 6-7 kb, kodirajo transpozazo, nimajo pa genov za konjugativni prenos. Prav tako je *tetQ* edini funkcionalni gen operona *tetQ-rteA-rteB*, ki je pri bakterijah iz rodu *Bacteroides* sicer prisoten v konjugativnih transpozonih iz družine CTnDOT. Gen *rteB* je v elementih prevotel odsoten, *rteA* pa nepopoln (Tribble in sod., 2010).

Poskus prenosa najbolj razširjenega konjugativnega transpozona CTnDOT iz vrst *Bacteroides* v seve *P. ruminicola* in *P. bryantii* B₁₄ ni bil uspešen. Dokazali pa so možnost prenosa CTn12256 v *P. bryantii* B₁₄ in v primeru CTn7853 tudi prenos v obratno smer, iz prevotele v bakteroide. Preneseni gen *tetQ* obej konjugativnih transpozonov nudi gostiteljskemu sevu B₁₄ odpornost proti tetraciklinu. Prav tako se v prevoteli izraža gen *ermG*, ki leži na CTn7853, čeprav ne tako uspešno kot v donorskih sevih iz rodu *Bacteroides*. Geni *ermF*, ki so jih do sedaj vnesli v prevotele, prejemniku niso nudili

odpornosti proti antibiotiku (Nikolich in sod., 1994b). O uspešnem prenosu dveh genov za odpornost proti antibiotikom (tetraciklinu in penicilinu) iz ustnih bakterij *P. intermedia* in *P. denticola* v bakterije rodu *Prevotella* in *Bacteroides* poročata tudi Guiney in Bouic (1990). Pokazala sta, da se gena prenašata skupaj in zato najverjetneje ležita na konjugativnem transpozonusu. Prenos hipotetičnega elementa v *B. fragilis* je bil 100× redkejši kot v bakterije istega rodu. Tetraciklin ni vplival na pogostost prenosa elementov.

Primeri kažejo, da se horizontalni prenosi genov lahko dogajajo med bakterijami različnih rodov, ki običajno naseljujejo različne dele gostitelja (ustna votlina in črevo človeka) ali celo med bakterijami različnih gostiteljev (prebavni trakt človeka in goveda) (Nikolich in sod., 1994a; Scott, 2002; Whittle in sod., 2002; Roberts in Mullany, 2005). Prenos genov za odpornost proti tetraciklinu med bakterijami, ki naseljujejo ustno votlino in prebavni trakt je zaskrbljujoč, ker se peridentalne bolezni zdravijo s tetraciklinom, proti kateremu bi lahko množično postale odporne tudi bakterije ustne votline (Whittle in sod., 2002).

2.2.2 Pogostost horizontalnih genskih prenosov

Verjetnost in pogostost HGT je odvisna od okolja, gena oz. elementa, ki se prenaša, vrste horizontalnega prenosa in mikroorganizma (Andam in sod., 2010). Kompaktnost genoma in združevanje genov v operone omogoča pridobitev novih lastnosti s prenosom relativno majhnega dela DNA, obstajajo pa tudi mehanizmi, ki otežujejo uspešnost HGT s preprečitvijo privzema in stabilizacije DNA, ki izvira iz filogenetsko oddaljenega organizma. Verjetno najpomembnejši med njimi je restriktivno modifikacijski mehanizem recipienta (Norman in sod., 2009).

Specifične zahteve vsake vrste prenosa DNA med celicami vplivajo na njihovo pogostost v različnih okoljih. Gola DNA je v naravnem okolju nestabilna, ker jo razgradijo nukleaze. V primerjavi s transformacijo je transdukциja bolj varen način za prenos DNA v drugo celico, ker je zaščitena pred direktnimi vplivi okolja. Ker imajo fagi običajno ozek krog gostiteljev, poteka izmenjava DNA pri transdukciji, podobno kot pri transformaciji, znotraj bakterijskih vrst ali med zelo podobnimi vrstami. Njuno vlogo lahko primerjamo z rekombinacijo pri spolnem razmnoževanju evkariontov. Kot transdukcija tudi konjugacija nudi zaščito DNA pred zunajceličnimi vplivi. Ker konjugacija zahteva kontakt med celicami, se zdi, da to predstavlja omejujoč dejavnik pri prenosu, vendar obstajajo dokazi za mnoge konjugativne dogodke med filogenetsko oddaljenimi prokarionti. Nekatere raziskave so dokazale celo konjugativni prenos plazmidov med domenami, t.j. iz prokariontskih v evkariontske celice (Norman in sod., 2009).

Verjetnost, da se bodo geni prenesli s HGT, se med geni razlikuje. V skladu s hipotezo kompleksnosti so informacijski geni, ki sodelujejo v procesih transkripcije, translacije in drugih podobnih procesih, redkeje preneseni s HGT, ker so del kompleksnejšega sistema in

je manj verjetno, da bi njihovi produkti pravilno delovali v tuji celici. Nasprotno se bodo z večjo verjetnostjo prenesli operativni geni, npr. geni, vključeni v sintezo aminokislin, in hišni geni, na katere vpliva šibka selekcija in so organizirani v kompaktne operone (Jain in sod., 1999). Za ohranjanje operona s HGT je pomembna fizična bližina genov (Dutta in Pan, 2002).

HGT se dogaja v praktično vseh okoljih (Filonov in sod., 2010; Kelly in sod., 2009; Nakhamchik in sod., 2010). Poleg tega, da okolje s svojimi lastnostmi in fizičnimi pregradami omejuje skupino mikroorganizmov, znotraj katere poteka HGT, ter posledično omeji nabor genov za izmenjavo med mikroorganizmi, vpliva na gostoto mikrobne rasti (npr. preko možnosti pritrjevanja in količine hranil), izvaja selekcijski pritisk na spremenjene ter pridobljene gene, narekuje tudi vrsto HGT in njihovo pogostost. Preko teh procesov okolje posredno vpliva na evolucijo prokariontov (Norman in sod., 2009). Zelo pogoste HGT omogočajo mikrobeni biofilmi in ekosistemi z veliko gostoto mikroorganizmov kot so npr. v prebavnem traktu človeka in živali (Salyers in sod., 2004a).

Zelo težko je preučevati in oceniti, kako pogosto se dogajajo horizontalni prenosи genov v naravi, vendar ocene pogostosti HGT na podlagi fizioloških raziskav v čistih kulturnah verjetno podcenjujejo pomembnost HGT za mikrobeno ekologijo in evolucijo v naravi (Norman in sod., 2009). Lažje kot pogostost prenosov genov ocenimo število genov, privzetih s HGT, čeprav se tudi ta precej razlikuje glede na uporabljeni metodo (Brown, 2003).

2.2.3 Prepoznavanje konjugativnih transpozonov in genov pridobljenih s HGT

Za odkrivanje mobilnih elementov in genov pridobljenih s HGT obstaja več načinov. Dogodke horizontalnih prenosov genov običajno odkrivamo in kvantificiramo z analizo razpoložljivih nukleotidnih sekvenc, pri čemer so rezultati odvisni od uporabljenih metod, zaznamo pa le uspešne dogodke rekombinacije in integracije, ki se ohranijo skozi daljši čas ter različne selekcijske pritiske (Norman in sod., 2009). Privzete gene lahko prepoznamo glede na njihove fenotipske lastnosti, netipične lastnosti sekvence in filogenetske razporeditve v določenih linijah. Pri iskanju konjugativnih elementov se opiramo tudi na prepoznavanje za njih značilnih motivov, vendar iskanje zgoraj omenjenih lastnosti služi le kot presejalni test, ki nam pove, katere regije je vredno podrobnejše preučiti. Netipične lastnosti imajo lahko tudi nekateri geni, katerih produkti opravljajo specifično funkcijo in imajo zaradi tega npr. drugačno sestavo aminokislin (Dutta in Pan, 2002). Velja, da so geni, katerih lastnosti sekvence se razlikujejo od prevladujočih lastnosti genoma, njihovi produkti pa nimajo bistveno drugačne sestave AK, zelo verjetno privzeti s HGT.

Genetski material, privzet s HGT, ima drugačne lastnosti sekvence kot gostiteljski genom, zato ga lahko prepoznamo z bioinformacijsko analizo. DNA je bila najverjetneje privzeta s

HGT, če je bolj podobna sekvencam iz filogenetsko oddaljenih mikroorganizmov kot iz sorodnih vrst. Pri bakterijah iz rodu *Bacteroides*, ki so genetsko precej raznolike, je pomembno tudi spremljanje enakih genov v različnih vrstah. Povprečna podobnost med vrstami pri DNA-DNA hibridizaciji je le 40-50 %. V splošnem velja, da lahko v primeru, ko v dveh različnih vrstah najdemo gena, ki imata več kot 95 % podobnost, z veliko gotovostjo trdimo, da se je gen med njima prenesel s horizontalnim prenosom (Salyers in sod., 2007b). Ker se pridobljene lastnosti z vertikalnim prenosom prenesejo le na potomce recipientskega seva, v sorodnih taksonih pa ti geni niso prisotni, ob rekonstrukciji filogenetskih dreves opazimo razpršeno filogenetsko razporeditev. Filogenetski vzorec takšnih genov pogosto ne sovpada z vzorcem genov za rRNA, zato je do določene mere pomembna tudi primerjava. Če je lastnost prisotna le v eni liniji ali vrsti, je bolj verjetno, da je bila pridobljena s HGT, kot da je bila neodvisno izgubljena v več linijah, vendar pa ne moremo izključiti možnosti, da se je lastnost v več linijah razvila neodvisno, preko točkastih mutacij (Ochman in sod., 2000).

Z bioinformacijsko analizo iščemo tudi gene, katerih lastnosti se bistveno razlikujejo od povprečnih lastnosti genoma, saj to kaže, da so bili verjetno pridobljeni s HGT. Starejše horizontalne dogodke je težje prepoznati kot novejše, ker od trenutka vključitve dedni material prične pridobivati lastnosti recipientskega seva (Brown, 2003; Dutta in Pan, 2002). Na podlagi tega lahko poskušamo oceniti tudi čas, ki je pretekel od vključitve različnih genov, pridobljenih s HGT (Dutta in Pan, 2002). Geni vsakega kromosoma so podvrženi določenim mutacijskim pritiskom, ki so odvisni od lastnosti replikacijskega aparata organizma, kot so razmerje razpoložljivih dNTP, napake polimeraze DNA, učinkovitost popravljalnega sistema itd. Za organizem značilna je tudi uporaba kodonov in delež gvanina in citozina (% GC) v sekvenci. S tem pristopom težje prepoznamo regije, pridobljene s HGT, pri katerih so značilnosti sekvence drugačne, vendar ne zelo različne od preostalega dela kromosoma (Schlesinger in sod., 2007).

Ob genih, ki so se prenesli s HGT, pogosto ležijo ostanki genov ali geni, ki so omogočili prenos (sekvence za delovanje integraze, plazmidna mesta *oriT*, translokacijski elementi) in jih lahko uporabimo za orientacijo pri iskanju oz. kot potrditev prenosa. Pri raziskavah hišnih genov konjugativnih transpozonov, t.j. genov za izrez, prenos in vključitev, so ugotovili, da se že v majhnem številu konjugativnih transpozonov, ki jih poznamo, precej razlikujejo. Čeprav niso enotni, pa nam lahko kljub temu pomagajo odkriti regije, ki jih je potrebno podrobneje raziskati. Geni za izrez elementov so zaradi večje variabilnosti manj primerni; že pri lambdoidnih fagih so razlike v proteinu Xis prevelike, da bi lahko služil kot zanesljiv marker. V mnogih konjugativnih transpozoni in konjugativnih plazmidih se pojavljajo homologi proteina TraG, ki sodeluje pri prenosu CTnDOT. Na podlagi tega gena sicer ne bi mogli ločiti med vrstami mobilnih elementov, vendar bi kot že omenjeno zgoraj nakazal, katera področja bi bilo potrebno podrobneje raziskati (Salyers in sod.,

2004b). Na tak način so odkrili hipotetični transpozon CTn3-Bf v bakteriji *Bacteroides fragilis* (Schlesinger in sod., 2007).

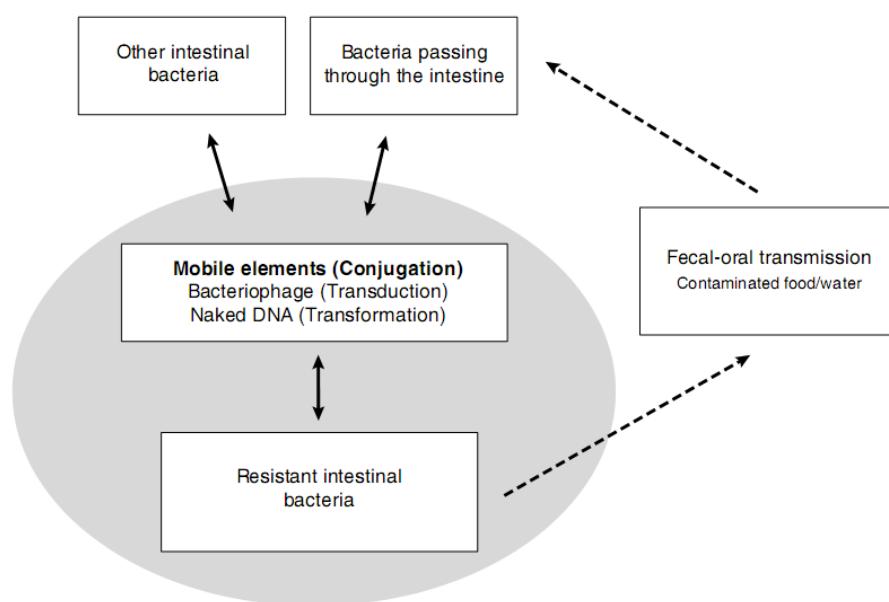
Preučevanje in prepoznavanje mobilnih elementov ter načina prenosa je še posebej pomembno za preučevanje širjenja genov za odpornost proti antibiotikom. Z ustreznim znanjem bi lahko morda odkrili snovi in razvili načine, s katerimi bi zavrli prenos elementov z nezaželenimi geni ali rast bakterij, ki jih vsebujejo in so zato lahko škodljive. Konjugativni transpozoni niso udeleženi le pri nezaželenem razširjanju genov za odpornost proti antibiotikom med bakterijami, ampak lahko služijo tudi kot pripomoček pri genetskih raziskavah. Predvsem je pomembno odkritje konjugativnih transpozonov v anaerobnih bakterijah prebavnega trakta, katerih genetika je slabo poznana. Z vnosom novih ali prekinivijo obstoječih genov s pomočjo konjugativnih transpozonov bi bilo mogoče preučiti funkcijo in vlogo bakterij v prebavnem traktu. Omogočili bi manipulacijo bakterij, za katere do sedaj ni bilo ustreznih vektorskih sistemov. Lahko bi nadomestili uporabo plazmidov kot vektorjev, saj so bolj stabilni kot plazmidi, ki potrebujejo stalen selekcijski pritisk, da se ohranijo. Seveda pa so za uspešno selekcijo recipientov pri vnosu konjugativnih transpozonov ravno tako kot pri vnosu plazmidov potreben selekcijski markerji (Scott, 2002).

2.2.4 Horizontalni genski prenosi v prebavnem traktu in hipoteza o rezervoarju genov za odpornost proti antibiotikom

Salyers in sodelavci (2004a) trdijo, da bakterije iz človeških prebavil predstavljajo rezervoar genov za odpornost proti antibiotikom. Osredotočili so se na bakterije rodu *Bacteroides*, ki predstavljajo znaten delež mikrobne združbe v prebavilih ljudi in so tam številčnejše kot v kateremkoli drugem okolju. Med njimi najdemo tudi pogojno patogene vrste (npr. *Bacteroides fragilis* in *Bacteroides thetaiotamicron*), ki lahko povzročijo resne okužbe.

Da bakterije služijo kot rezervoar genov za odpornost proti antibiotikom, morajo biti sposobne pridobiti in prenesti gene drugim vrstam bakterij. Velika koncentracija mikroorganizmov v črevesju človeka ($10^{12}/g$ vsebine) in prebavilih drugih živali, velika količina hranih ter površin za pritrdiritev (stena prebavil, delci hrane) tvorijo ugodne razmere za horizontalne prenose genov med bakterijami. Komenzalne bakterije pridejo v stik z mikrobi iz hrane, ustne votline, respiratornega trakta in drugih prebavnih traktov (slika 5), s katerimi lahko izmenjujejo genski material (Whittle in sod., 2002), med katerimi sta npr. tudi patogeni bakteriji *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus pneumoniae* (Salyers in sod., 2004a). Bakterije, ki v prebavilih niso običajne (*S. pneumoniae*) ali se pojavljajo v majhnem številu (*C. perfringens*, *E. faecalis*), lahko znatno prispevajo k širjenju genov, saj se ti lahko prenesejo v bakterije, ki v črevesu prevladujejo. Takšen primer so odkriti geni za odpornost proti eritromicinu v vrstah rodu *Bacteroides*. Ti geni imajo znatno nižji % GC

(*ermF*-33 %, *ermG*-27 %, *ermB*-33 %) kot je povprečna vrednost GC v genomih bakteroidov, t.j. 40 %, njihove sekvence pa so skoraj enake tistim iz po Gramu pozitivnih bakterij (Shoemaker in sod., 2001). S tem normalna mikrobiota pridobi nove gene, zaradi katerih je lahko bolj nevarna svojemu gostitelju. Prav tako lahko mikroorganizmi, ki niso del normalne mikrobiote pridobijo in preko fekalij prenesejo nove gene v druga okolja (npr. ustna votlina, koža). Pridobivanje novih ali širjenje obstoječih genov za odpornost proti antibiotikom med komenzalnimi bakterijami lahko predstavlja resno težavo ob operaciji ali poškodbi, pri kateri pride do okužbe z normalno mikrobioto, saj so prisotni tudi pogojno patogeni mikroorganizmi, kot so *Escherichia coli*, bakterije rodov *Enterococcus*, *Clostridium* in *Bacteroides*.



Slika 5: Shema prenosa mobilnih genetskih elementov med bakterijami prebavnega trakta in tistimi, ki prebavni trakt le prehajajo (Salyers in sod., 2007b).

Figure 5: Scheme of horizontal gene transfer between the bacteria of gastrointestinal tract and those swallowed, passing by through the intestine (Salyers et al., 2007b).

Širjenje genov za odpornost proti antibiotikom pripisujejo pogosti uporabi antibiotikov v zdravstvu in živinoreji. Dodajanje antibiotikov v krmo živali vpliva na selekcijo odpornih bakterijskih sevov v njihovih prebavilih. Do določene mere to predstavlja nevarnost za ljudi, saj lahko ob direktnem stiku z živalmi, preko fekalno-oralnega prenosa ali ob neustrezni pripravi mesa (pri prenizki temperaturi) bakterije odporne proti antibiotikom vstopijo v človeška prebavila, kjer lahko izmenjajo gene z normalno črevesno mikrobioto. Pogosta uporaba antibiotikov v zdravstvu prav tako vpliva na selekcijo odpornih sevov bakterij v prebavilih, lahko pa tudi direktno vzpodbudi širjenje elementov, na katerih se te geni nahajajo, kot je npr. uporaba tetraciklina prispevala k razširjanju konjugativnega transpozona CTnDOT med bakterijami iz rodu *Bacteroides* (Salyers in sod., 2004a). Skrb

pri razširjanju genov s konjugativnim transpozoni ali plazmidi vzbuja tudi zbiranje nekaterih genov za odpornost proti antibiotikom v integronih, ki se nato lahko vstavijo v mobilne elemente oziroma zbiranje teh genov na elementih samih. Tako pozitivna selekcija, ki deluje na en gen v integronu ali mobilnem elementu ohranja tudi vse ostale (Salyers in sod., 2007a).

2.3 ODPORNOST PROTI MONENZINU

2.3.1 Spreminjanje presnove v vampu

V intenzivni živinoreji je glavno vodilo optimizacija reje v smeri čim večje prieje v čim krajšem času oziroma s čim manjšim vložkom. Pri tem je pomembna količina oz. izkoristek zaužite krme živali, pri čemur na področju govedoreje igra pomembno vlogo mikrobna združba vamp, saj je nepogrešljiva pri razgradnji krme, predvsem rastlinskih polisaharidov. Glavni cilji manipulacije vampnega metabolizma so (Nagaraja in sod., 1997):

- povečati obseg in hitrost fermentacije rastlinskih strukturnih polisaharidov (celuloza, hemiceluloza, pektin), ki je precej počasnejša kot fermentacija rezervnih polisaharidov (škrob, fruktozani)
- upočasniti hitrost fermentacije škroba zaradi nevarnosti acidoze, ki je običajno posledica hitre rasti bakterije *Streptococcus bovis* in vrst iz rodu *Lactobacillus*, katerih glavni fermentacijski produkt je mlečna kislina, vendar povečati obseg njegove razgradnje v vampu
- zmanjšati nastajanje mlečne kisline ali pospešiti njeni fermentaciji zaradi nevarnosti acidoze
- povečati produkcijo propionata in zmanjšati produkcijo metana, ki se iz vampa odstranjuje z izrigavanjem in predstavlja energetsko izgubo ter prispeva k emisiji toplogrednih plinov
- upočasniti oz. zmanjšati razgradnjo proteinov v vampu, ker se presežek amonijaka, ki se sprošča pri razgradnji proteinov, absorbira skozi stene vampu in v jetrih pretvori v sečnino, ki se izloči s sečem

Presnovo v vampu lahko spremojamo na nivoju krme ali mikrobne združbe vamp. Krmo lahko fizikalno, kemično ali biološko obdelamo, tako da povečamo razgradljivost rastlinskih strukturnih polisaharidov (Fahey in sod., 1993) ali zaščitimo beljakovine krme pred razgradnjo v vampu (Schwab, 1995). Za optimizacijo želenih hidrolitičnih aktivnost lahko prilagajamo pogostost in zaporedje obrokov (Nagaraja in sod. 1997), za večjo hranilno vrednost krme pa lahko uporabimo transgene rastline (Altenbach in Townsend, 1995; Halpin in sod., 1995). Na mikrobno združbo vampa lahko vplivamo z uporabo krmnih dodatkov ali genskim spremjanjem mikroorganizmov.

Krmni dodatki so v Zakonu o spremembah in dopolnitvi zakona o krmni (2004) definirani kot snovi, mikroorganizmi ali pripravki, ki niso posamična krmila niti premixi, in posebni proizvodi, ki se namenoma dodajajo krmni ali vodi in ugodno vplivajo na lastnosti krme, živalskih proizvodov ali na rejo, priejo ali počutje živali, zlasti z vplivom na mikroorganizme prebavnega trakta ali prebavljenost krme. Kot krmni dodatki se uporabljam antibiotiki, inhibitorji sinteze metana, nevtralizirajoči agensi, inhibitorji proteolize, peptidolize in deaminacije, rastni faktorji, maščobe, probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki, mikrobeni encimi, rastlinski izvlečki (Ferme, 2008).

V živinoreji se antibiotiki uporabljam kot terapevtiki in krmni dodatki, ki prispevajo k hitrejši rasti živali in večemu izkoristku hranil. Sprva so se uporabljali pri reji piščancev, nato pa tudi pri reji prašičev in goveda. Tako je bil ionoformni antibiotik monenzin razvit kot kokcidiostatik za rejo piščancev, kasneje pa so ugotovili, da tudi pri reji govedi in ovc poveča izkoristek hranil (Russell in Houlihan, 2003). Monenzin je najbolje poznan pod komercialnima imenoma Rumensin in Coban, ki ju proizvaja podjetje Eli Lilly and Company. Prvi proizvod je namenjen uporabi v reji goveda, drugi pa pri reji perutnine.

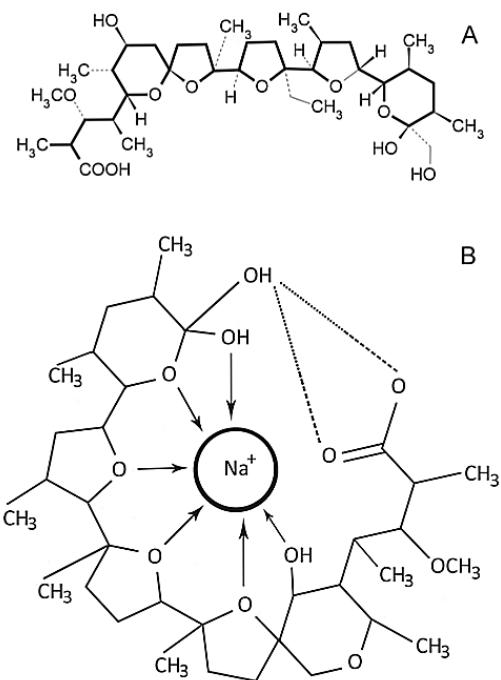
Leta 2006 je Evropska unija zaradi strahu pred nekontroliranim pojavom in širjenjem odpornosti proti antibiotikom prepovedala uporabo vseh antibiotikov kot krmnih dodatkov, razen kokcidiostatikov in sredstev proti histomonijazi (Uredba Evropskega parlamenta in Sveta..., 2003) kar pa je povzročilo rast stroškov reje. Zato so se v zadnjih letih raziskave usmerile v iskanje alternativnih krmnih dodatkov, predvsem rastlinskih izvlečkov, vendar do sedaj niso odkrile učinkovite alternative ionoformnim antibiotikom. Nekatera opažanja budijo dvome o upravičenosti prepovedi uporabe ionoformnih antibiotikov in pozivajo k nadaljnemu raziskovanju mehanizma in prenosa odpornosti proti ionoformnim antibiotikom: a) za zdravljenje bakterijskih okužb v medicini in veterini ionoformnih antibiotikov ne uporabljamo, b) do sedaj v bakterijah niso poznani genetski elementi, ki bi omogočali odpornost proti ionoformnim antibiotikom, c) ni dokazov, da bi se takšen tip odpornosti lahko prenašal med bakterijami, d) naravno odporne bakterije proti ionoformnim antibiotikom so našli v živalih, ki nikoli niso dobivale ionoformnih antibiotikov (Russell in Houlihan, 2003).

V Evropi se ionoformni antibiotiki zaradi manjših čred in namembnosti živine tako za proizvodnjo mesa kot mleka tudi pred prepovedjo niso uporabljali tako intenzivno kot v ZDA, Avstraliji, Novi Zelandiji in Latinski Ameriki, kjer jih rutinsko dodajajo krmni pri reji klavne živine (Aarestrup, 2000). Čeprav je monenzin kot krmni dodatek v Evropi prepovedan, pa je še vedno dovoljen kot kokcidiostatik pri reji perutnine, zato bi bilo smiselno ugotoviti, kakšen je mehanizem odpornosti in ali res obstaja možnost, da se ta lahko širi med bakterijami.

2.3.2 Mehanizem delovanja ionofornih antibiotikov

Ionoformi antibiotiki vplivajo na membrane, vendar imajo drugačen mehanizem delovanja kot polimiksini. Kemijsko so ionofori lipofilni polietri, kopičijo se v celičnih membranah in katalizirajo hiter prenos ionov (Rutkowski in Brzezinski, 2013). Delujejo kot antiporterji, tako da penetrirajo celično membrano, kjer v nasprotni smeri preko nje prenašajo monoivalentne ali divalentne ione ter protone. Smer prenosa ionov, katerih prenos je selektiven, je odvisna od njihovega gradiента. Boljše delujejo pri nižjem pH. Ker celice poskušajo uravnovesiti koncentracije ionov z aktivacijo ATPaz in transporterjev, se sčasoma izčrpajo.

Monenzin je ionoforni antibiotik, ki ga proizvaja bakterija *Streptomyces cinnamonensis*. Preferenčno veže monoivalentne katione Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Li^+ , pri čemer tvori pseudociklično obliko (slika 6), ki jo utrdijo vodikove vezi med začetkom in koncem molekule (Chapman in sod., 2010). Atomi kisika so obrnjeni v notranjost strukture, alkilne skupine pa navzven, zaradi česar je struktura lipofilna. Monenzin iz celic prenaša kalijev v celice pa natrijev ion (Russell, 1987), saj je koncentracija natrija v vampu 2-10× višja kot v celici.



Slika 6: A) Kemijska struktura monenzina, B) konformacija ob vezavi kationa (Chapman in sod., 2010).
Figure 6: A) Chemical structure of monensin, B) conformation of monensin when bound to a cation (Chapman et al., 2010).

Ionoformi antibiotiki se uporablja v živinoreji kot kokcidiostatiki, predvsem pri reji perutnine, in kot pospeševalci rasti v govedoreji. Zaradi nespecifičnosti delovanja, ionoformih antibiotikov ne uporabljam v terapevtske namene, saj prenašajo ione tudi preko celične membrane sesalcev (Russell in Houlihan, 2003). Monenzin v živalskih celicah poškoduje mitohondrije, upočasni in zavira endocitozo, spremembra pH pa vpliva na transport in sekrecijo snovi iz celice, posledično se zaradi omejene sekrecije spremeni površina celice (Łowicki & Huczyński, 2013). Nekatere živali prenašajo koncentracije, ki so potrebne za inhibicijo manj odpornih bakterij, vendar je ta lastnost odvisna od vrste živali (Russell in Houlihan, 2003).

2.3.3 Vpliv monenzina na mikrobno združbo vampa

Deluje tako, da vpliva na mikrobno združbo vampa, ki pri hidrolizi rastlinskih polisaharidov posledično proizvaja manj stranskih produktov kot je npr. okoljsko škodljivi metan in več kratkoverižnih maščobnih kislin, ki jih gostitelj uporabi za rast in razvoj (Russell in Houlihan, 2003).

In vitro in *in vivo* eksperimenti so pokazali, da monenzin zmanjša količino nastalega metana, vendar metanogene arheje niso posebej občutljive nanj. Monenzin inhibira vodik-producirajoče bakterije, ki proizvajajo vodik, potreben v procesu metanogeneze. Ker so vodik-producirajoče bakterije, katerih glavna fermentacijska produkta sta ocetna in maslena kislina, v prisotnosti monenzina inhibirane, se razmerje KMK spremeni v prid propionski in jantarni kislini. Sposobnost ionoformih antibiotikov, da zmanjšajo nastanek metana in spremenijo razmerje KMK pri fermentaciji, pojasni le tretjino potencialnega porasta izkoristka hrani. Monenzin prepreči tudi izgubo energije preko deaminacije aminokislin z inhibicijo obligatnih aminokisline fermentirajočih bakterij, sorodnih klostridijem. Ionoformi antibiotiki ne zavirajo razgradnje škroba, nekatere raziskave pa kažejo na morebitno zaviranje razgradnje celuloze. Pogosto pride do manjšega vnosa krme, pri čemur ima mikrobna združba več časa za razgradnjo hrani (Russell in Houlihan, 2003).

Raziskave *in vitro* so pokazale, da so praživali, ki lahko predstavljajo tudi do 50 % mikrobnih proteinov v vamu, občutljive na monenzin, čeprav se v poskusih *in vivo* njihovo število ni zmanjšalo. Vampne glive, ki so pomembne pri krmi z velikim deležem vlaknin, so prav tako občutljive nanj (Russell in Houlihan, 2003).

Pri rezultatih raziskav *in vitro* in *in vivo* lahko pride do razhajanju, najverjetneje zaradi razlik v bakterijski masi, ki je v vamu precej večja kot pri poskusih *in vitro*, in sposobnosti vezave ionoformih antibiotikov nanjo ter na druge materiale kot so delci krme in praživali. Pogosto se v raziskavah *in vitro* uporablja koncentracija monenzina 5-10 µM, ki je izračunana na podlagi povprečne prostornine vampa (70 L) in priporočenega dnevnega vnosa monenzina (350 mg) (Russell in Houlihan, 2003).

2.3.4 Mehanizem odpornosti proti ionoformnim antibiotikom

Bakterije, ki proizvajajo ionoforme antibiotike, so naravno odporne, vendar natančen mehanizem odpornosti ni poznan. Naravno odpornost proti tetronezinu naj bi bakteriji *Streptomyces longisporoflavus*, ki ga proizvaja, nudil ABC transporter (Linton in sod., 1994). Ionoforme antibiotike lahko bakterije in sesalci encimsko razgradijo, vendar le v prisotnosti kisika (Russell in Houlihan, 2003).

Proti ionoformnim antibiotikom odpornejše bakterije imajo pogosto membransko vezano fumaratno reduktazo, za katero domnevajo, da bi lahko omilila oz. izničila delovanje monenzina s translokacijo protonov. Tudi proti monenzinu odpornejši sevi bakterije *P. ruminicola* imajo večjo fumaratno aktivnost kot občutljivejši sevi, znan pa je primer bakterije *Ruminococcus flavefaciens*, ki ima veliko fumaratno aktivnost, a je občutljiva na monenzin (Morehead in Dawson, 1992).

Običajno so na monenzin bolj občutljive po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije, vendar tudi tu obstajajo izjeme. Nekatere po Gramu negativne bakterije so občutljive na monenzin, a lahko po izpostavitvi postanejo odporne. Na monenzin adaptiran sev *P. bryantii* B₁₄ je bil glede na meritve iztoka kalijevih ionov iz celice 16× bolj odporen kot neadaptiran sev (Callaway in Russell, 1999). Primerjava 15 sevov prevotel je pokazala, da je razlika v občutljivosti na monenzin med njimi lahko tudi 100-kratna in da se le nekateri sevi lahko znatno adaptirajo na prisotnost monenzina (Callaway in Russell, 2000). Prav tako se lahko na monenzin adaptirajo nekatere po Gramu pozitivne bakterije, npr. *Streptococcus bovis* (Callaway in sod., 1999) in *Clostridium aminophilum* (Rychlik in Russell, 2002). Callaway in Russell (2000) sklepata, da je bila v primeru seva *P. bryantii* B₁₄ v začetni kulturni prisotna mešanica odpornih in neodpornih bakterij, ter da neodporne nadomestijo odporne bakterije po umiku monenzina.

K odpornosti proti monenzinu lahko prispevajo tudi ekstracelularni polisaharidi vampnih bakterij. Celice *P. bryantii* B₁₄ (Callaway in Russell, 1999) in *C. aminophilum* F (Rychlik in Russell, 2002), adaptirane na monenzin, so bile v suspenziji bolj razpršene, lizocim pa ni povzročil aglutinacije kot pri neadaptiranih celicah. O izdelavi ekstracelularnih polisaharidov pri vampnih bakterijah ni veliko znanega, raziskave pri ostalih bakterijah pa kažejo, da jih kodira veliko število inducibilnih genov. Pri bakterijah *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* so pokazali, da je bila odpornost proti monenzinu povezana z odebeleno celično steno ali glikokaliksom (Simjee in sod., 2012). Ker se odporne celice v nobenem primeru niso ohranile po umiku monenzina, je malo verjetno, da je za odpornost odgovoren eden izmed običajnih vzrokov, npr. encimska razgradnja antibiotika ali aktivno izčrpavanje antibiotika iz celice, in da je genetskega značaja (Russell in Houlihan, 2003).

V raziskavah odpornosti proti antibiotikom se običajno uporablja suspenzija celic, v naravnem okolju pa se bakterije večkrat pojavljajo v biofilmih, kjer rastejo počasneje, proizvajajo več ekstracelularnih polisaharidov in so običajno bolj odporne proti antibiotikom kot celice v suspenziji. Veliko vampnih bakterij je pritrjenih na delce hrane, vendar so ti biofilmi drugačni od biofilmov, ki so pomembni v medicini. Biofilmi vampnih bakterij so bolj aktivni, v okolico izločajo encime za razgradnjo substrata ter privzemajo razgradne produkte. Rast vampnih bakterij je relativno hitra, delci krme pa se v vampu zadržijo malo časa. Vpliv hitrosti rasti vampnih bakterij na odpornost proti ionoformnim antibiotikom še ni bila podrobno preučena, vendar raziskave s *P. bryantii* kažejo, da so počasneje rastoče celice bolj občutljive na monenzin. Raziskovalci domnevajo, da opažanja odpornosti v biofilmih za ekosistem vampa ne veljajo (Russell in Houlihan, 2003).

2.3.5 Razširjanje odpornosti proti ionoformnim antibiotikom

Odpornost proti antibiotikom se lahko hitro razvije in razširi. Prisoten je strah pred prenosom odpornosti proti antibiotikom z živali na človeka, ker (i) imajo živali, krmljene z antibiotiki več odpornih bakterij kot živali, ki niso prejemale antibiotikov, (ii) se lahko geni za odpornost prenesejo v bakterije, ki se prenašajo s hrano, (iii) delavci na kmetiji imajo včasih več odpornih bakterij kot tisti, ki nimajo stika s kmetijo, čeprav niso bili zdravljeni z antibiotiki. Nekatere raziskave poročajo, da se je število odpornih bakterij po opustitvi antibiotikov kot krmnih dodatkov zmanjšalo, vendar so rezultati različnih raziskav nasprotujoči (Russell in Houlihan, 2003).

Hipotezo, da je odpornost proti ionoformnim antibiotikom prej posledica fenotipske selekcije kot mutacije ali privzema novih genov, podpira več raziskav. Meritve toka kalijevih ionov skozi membrano v prisotnosti ali odsotnosti monenzina (Lana in Russell, 1996) kažejo na to, da je bila odpornost proti monenzinu prisotna že pred krmljenjem živali z monenzinom, da se je povečana odpornost proti monenzinu pojavila zelo hitro in da se po prenehanju dodajanja monenzina živalim ni ohranila. Zadnjo točko so potrdile raziskave mikrobine združbe tako goveda kot ovac (Rogers in sod., 1997).

Ionoformni antibiotiki se uporabljajo v govedoreji že več kot 35 let, vendar do sedaj ni bilo dokazov, da se odpornost proti ionoformnim antibiotikom povečuje (Russell in Houlihan, 2003). Dawson in Boling (1983) v sicer kratkoročni študiji ugotavlja, da je bilo 60 % izolatov iz vampa goveda odpornih proti monenzinu, čeprav mu živali nikoli niso bile izpostavljene. V času krmljenja živali z monenzinom se je delež odpornih bakterijskih izolatov nekoliko povečal, vendar ni bil signifikantno drugačen od deleža odpornih izolatov v času krmljenja pred dodatkom in po opustitvi dodajanja monenzina v krmo. Bakterije, odporne proti enemu ionoformnemu antibiotiku so lahko križno odporne tudi proti drugim ionoformnim antibiotikom, a se to ni zdelo zelo pomembno, ker jih ne uporabljamo

za terapevtske namene. Odpornost bakterij, adaptiranih na monenzin, proti terapevtskim antibiotikom še ni bila podrobno preučena, vendar so bile celice *P. bryantii* in *C. aminophilum*, ki so bile odporne proti monenzinu, enako ali bolj občutljive proti testiranim antibiotikom kot neadaptirane celice (Houlihan in Russell, 2003). Hipotezo, da se odpornost proti ionoformnim antibiotikom med bakterijami ne prenaša, podpirajo rezultati raziskav, v katerih so bile bakterije iz različnih rejnih živali (prašičev, goveda in perutnine) zelo redko odporne proti monenzinu (Aarestrup in sod., 1998; Butaye in sod., 2001). Kljub temu pa moramo upoštevati, da so indikatorske (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*), zoonotske bakterije (bakterije iz rodov *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella*) in živalski patogeni (*E. coli*, stafilokoki) filogenetsko relativno oddaljeni od prevotel in morda niso najbolj primerni organizmi, v katerih bi iskali znake potencialnega horizontalnega prenosa genetskih elementov, ki nudijo odpornost proti monenzinu, če le ti obstajajo.

Monenzin se hitro absorbira, metabolizira (O-demetilacija, oksidacija) in se iz telesa živali izloči preko žolča s fecesom (Donoho, 1984). Različne raziskave so pokazale, da ob priporočeni dnevni dozi monenzina 24 h po zadnjem dodatku monenzina piščancem niso zaznali monenzina v mišicah. Dlje se je zadržal v maščobnem tkivu, ledvicah in jetrih, v katerih običajno ni bil več zaznaven po 48-72 h od zadnje doze monenzina. V EU je predpisana prekinitev dodajanja monenzina v krmo piščancev 1 dan pred zakolom, v praksi pa naj bi bila obdobja reje brez monenzina pred zakolom še daljša (Chapman in sod., 2010). Pri govedu monenzina prav tako niso zaznali v mišicah, jetrih, ledvicah, maščobi in srcu po 12 h od zadnjega dodatka monenzina. Monenzin je v vampu relativno stabilen, pri prežvekovalcih se absorbira 40-50 % doze monenzina, medtem ko se v monogastričnih živalih absorbira večina. Monenzin se razgradi hitreje ob izpostavitvi gnoja naravnim vremenskim razmeram v obliki kopice kot ob inkubaciji pri 37 °C in anaerobnih razmerah. V zemlji na polju ali v rastlinjaku se je monenzin razgradil najhitreje, in sicer v enem mesecu. Gnoj krav, ki so prejemale monenzin in so ga uporabili za gnojenje na poljščine ni deloval fitotoksično (Donoho, 1984).

Ionoformni antibiotiki nikoli niso bili in malo verjetno tudi bodo uporabljeni kot terapevtski antibiotiki v humani medicini zaradi njihovega nespecifičnega delovanja. Tudi njihova uporaba v veterinarski medicini ni razširjena, saj jih dobro prenašajo le nekatere živali. Ker imajo ionoformni antibiotiki precej drugačen način delovanja kot terapevtski antibiotiki, raziskovalci sklepajo, da je malo verjetno, da bi bil mehanizem odpornosti enak kateremu od do sedaj znanih mehanizmov, ki nudijo bakterijam odpornost proti terapevtskim antibiotikom. Morda bi med poznanimi mehanizmi odpornosti proti monenzinu lahko pojasnila le tvorba glikokaliksa. Veliko vampnih bakterij je odpornih proti antibiotikom, čeprav živali niso bile krmljene z antibiotiki. Razlog za odpornost je po mnenju nekaterih raziskovalcev verjetneje fiziološka selekcija kot mutacija ali privzem novih genov. Geni, ki posredujejo odpornost, še niso bili identificirani, obstaja malo dokazov, da bi se odpornost proti ionoformnim antibiotikom širila med bakterijami. Glede na opažanja je tako malo

verjetno, da bi uporaba ionoformih antibiotikov kot krmnih dodatkov imela bistven vpliv na prenos odpornosti proti antibiotikom z živali na človeka (Russell in Houlihan, 2003).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BAKTERIJSKI SEVI

V raziskavi smo uporabili seve dveh vampnih bakterijskih vrst iz rodu *Prevotella*: *Prevotella ruminicola* 23^T, *Prevotella bryantii* B₁₄^T, *Prevotella bryantii* TC1-1, *Prevotella bryantii* TF1-3. Viri vseh sevov so navedeni v članku Avguština in sodelavcev (1994). Poleg sevov prevotel smo kot pozitivno kontrolo pri pomnoževanju gena *traG* uporabili sev *Bacteroides ovatus*^T z oznako DSM 1896 v zbirki mikroorganizmov DSMZ (Leibnitz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), ATCC 8483 v zbirki ATCC ali NCTC 11153 v zbirki NCTC (National Collections of Type Cultures).

3.2 PRIPRAVA GOJIŠČA IN GOJENJE VAMPNIH BAKTERIJ

Mikroorganizme smo gojili anaerobno, v Hungatovih epruvetah (Bellco Glass Inc., ZDA). Za pripravo tekočega gojišča M2, modificiranega po Hobsonu (Hobson, 1969), smo uporabili sestavine navedene v preglednici 1:

Preglednica 1: Sestava gojišča M2.

Table 1: Composition of M2 growth medium.

Sestavina	Koncentracija
tripton (Liofilchem, Italija)	1,0 ut. %
kvasni izvleček (Biolife, Italija)	0,25 ut. %
glukoza (Kemika, Hrvaška)	0,2 ut. %
celobioza (Calbiochem, Nemčija)	0,2 ut. %
topni škrob (Merck, Nemčija)	0,2 ut. %
NaHCO ₃ (Merck, Nemčija)	0,4 ut. %
L-cistein HCl (Sigma-Aldrich, ZDA)	0,1 ut. %
raztopina resazurina (Fluka, Švica)	0,001 vol. %
mineralna raztopina I	15,0 vol. %
• K ₂ HPO ₄ (Kemika, Hrvaška)	• 3 g/L
mineralna raztopina II	15,0 vol. %
• KH ₂ PO ₄ (Merck, Nemčija)	• 3,0 g/L
• (NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck, Nemčija)	• 6,0 g/L
• NaCl (Merck, Nemčija)	• 6,0 g/L
• MgSO ₄ × 7 H ₂ O (Merck, Nemčija)	• 0,70 g/L
• CaCl ₂ × 2 H ₂ O (Merck, Nemčija)	• 0,66 g/L
vampni sok	30,0 vol. %
destilirana voda (dH ₂ O)	40,0 vol. %

Vampni sok smo centrifugirali 30 min pri 10.000 vrt./min. Supernatant smo avtoklavirali in shranili pri 4 °C. Pripravljeni mineralni raztopini smo prav tako shranili pri 4 °C. Raztopino resazurina s koncentracijo 2 g/L smo pripravili v dH₂O.

Vse sestavine, razen L-cisteina HCl, smo zmešali in ob stalnem mešanju segreli do vretja oz. spremembe barve indikatorja resazurina iz modre v rdečo, nato pa prepihovali s kisika prostim CO₂, dokler rdeča barva indikatorja ni bila več opazna. Po 10 min prepihovanja smo dodali L-cistein HCl, gojišče prepihovali še 10 min, nato pa ga pod kisika prostim CO₂ razdelili v Hungatove epruvete in jih avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Pri pripravi vbodnikov za shranjevanje mikroorganizmov pri -20 °C, smo gojišču dodali 0,75 ut. % agarja (Sigma-Aldrich, ZDA), pri pripravi agarskih plošč pa 2 ut. %. Trdno gojišče smo v anaerobni komori (COY Laboratory Products Inc., ZDA) razlili v plastične petrijevke s premerom 9 cm, povprečno so vsebovale 22 mL gojišča. Na posamezno agarsko ploščo smo nanesli bakterijsko kulturo, zraslo v Hungatovi epruveti, in jo razmazali s sterilno vatirano palčko, da smo dosegli konfluentno rast bakterijske kulture. Nacepljene plošče smo inkubirali 24-48 h pri 37 °C. Natančnejši postopek dela je opisan v poglavju 3.5.6. Atmosfera v anaerobni komori je bila sestavljena pretežno iz kisika prostega CO₂ in manjšega deleža vodika, ki je s pomočjo paladija v vlogi katalizatorja reagiral z morebitnim kisikom, ki je v komoro vstopil ob vnosu predmetov vanjo.

Epruvete z 8 mL tekočega gojišča M2 smo vedno inokulirali s 100 µL (1,25 vol. %) bakterijske kulture pod kisika prostim CO₂. Bakterijske seve smo gojili anaerobno pri 37 °C. Rast bakterijskih sevov v tekočih kulturah smo spremljali z absorbanco pri 654 nm s spektrofotometrom Novaspec II (Amersham Pharmacia Biotech, Velika Britanija), za umerjanje instrumenta smo uporabili neinokulirano gojišče M2, pripravljeno v isti seriji kot gojišče za poskus.

3.3 IZOLACIJA GENOMSKE DNA

Iz preko noči zraslih bakterijskih kultur *P. bryantii* B₁4 in *P. ruminicola* 23 smo izolirali genomsko DNA po sledečem protokolu (Ausubel in sod., 1987):

- 1 mL kulture smo centrifugirali 5 min pri 10.000 ×g
- celice smo oprali v pufru TE in centrifugirali 5 min pri 10.000 ×g (mini Spin plus, Eppendorf, Nemčija)
- supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v 567 µL pufra TE
- dodali smo 3 µL proteinaze K (Thermo Fischer Scientific Inc., ZDA) in 30 µL 10-odstotnega SDS (Merck, Nemčija)
- mešanico smo inkubirali 1h pri 37 °C ali v termobloku (CH-100, Biosan, ZDA) pri 50 °C
- dodali smo 100 µL 5M NaCl (Merck, Nemčija) in premešali

- dodali smo 80 µL CTAB/NaCl, segretega na 65 °C, in premešali
- mešanico smo inkubirali 10 min pri 65 °C
- dodali smo enak volumen kloroforma (Merck, Nemčija), premešali, centrifugirali 5 min pri 10.000 ×g in prenesli vodno fazo v novo mikrocentrifugirko.
- ekstrakcijo smo ponovili z mešanico fenol:kloroform:izoamilalkohol, v razmerju 25:24:1, pH 8 (Sigma-Aldrich, ZDA)
- ekstrakcijo smo ponovili s kloroformom
- DNA smo oborili z 0,6 volumna izopropanola (Merck, Nemčija) in centrifugirali 5 min pri 10.000 ×g
- DNA smo sprali s 70-odstotnim etanolom in jo osušili
- DNA smo raztopili v 50 µL pufra TE

Pufer TE s pH 8 je vseboval 100 mM Tris-Cl (Gibco, Velika Britanija) in 10 mM EDTA (Merck, Nemčija), CTAB/NaCl pa 10 ut. % heksadeciltrimetil amonijevega bromida (Fluka, Švica) in 0,7 M NaCl. Uspešnost izolacije DNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (pogl. 3.4.3).

3.4 MOBILNI GENETSKI ELEMENTI

3.4.1 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *traG*

Z algoritmom BLASTN (Altschul in sod., 1990) smo poiskali gene, podobne genu *traG* bakterije *Bacteroides fragilis* YCH46 (preglednici 2 in 3). S programom Clustal (Larkin in sod., 2007) smo naredili poravnavo vseh zadetkov in v programu MEGA 4 (Tamura in sod., 2007) z metodo povezovanja sosedov (ang. neighbor-joining) narisali filogenetsko drevo sekvenc. Degenerirane začetne oligonukleotide smo poiskali s programom Primrose 2.1.7 (Ashelford in sod., 2002): kot tarčne sekvence smo definirali nukleotidne sekvence genov, ki so bile najbolj podobne genu *traG* iz *B. fragilis* (preglednica 2), drugo skupino genov pa smo definirali kot netarčne sekvence, v katerih začetni oligonukleotidi (ZO) niso prisotni (preglednica 3).

Izmed možnih ZO z dolžino 16-20 nukleotidov in največ dvema degeneriranim mestoma smo izbrali tiste, ki so najbolje ustrezali priporočilom (Abd-Elsalam, 2003). Temperaturo taljenja ZO, vsebnost GC in tvorbo sekundarnih struktur smo preverili s spletnim programom OligoAnalyzer 3.1 (OligoAnalyzer, 2008). Glede na kombinacijo lastnosti ZO, tvorbo dimerov in mesto naleganja na tarčno DNA smo izbrali 6 ZO (preglednica 4), ki so jih po naročilu sintetizirali v podjetju Microsynth AG v Švici.

Preglednica 2: Skupina tarčnih genov pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *traG*.
Table 2: Target genes for design of PCR primers for *traG* gene amplification.

Organizem	Gen
<i>Bacteroides uniformis</i> WH207	bst 010
<i>Bacteroides fragilis</i> YCH46	BF 2797
<i>Bacteroides coprocola</i>	BACCOP 1711
<i>Bacteroides ovatus</i>	BACCOVA 04779
<i>Bacteroides plebeius</i> 17135	BACPLE 02528

Preglednica 3: Skupina netarčnih genov pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *traG*.

Table 3: Non-target genes for design of PCR primers for *traG* gene amplification.

Organizem	Gen
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	BF 1767
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	bctA
<i>Bacteroides fragilis</i>	BFp 0010
<i>Bacteroides intestinalis</i> DSM 17393	BACINT 00391
<i>Bacteroides plebeius</i> DSM 17135	BACPLE 01303
<i>Bacteroides thetaiotamicron</i> VPI 5482	BT 0093
<i>Bacteroides vulgatus</i>	BVU 3371

Preglednica 4: ZO za pomnoževanje gena *traG* v bakteriji *P. bryantii* B₁4. Degenerirana mesta so napisana krepko.

Table 4: PCR primers for amplification of *traG* in *P. bryantii* B₁4. Degenerated nucleotides are written in bold.

Oznaka ZO	Sekvenca ZO (5'→3')
1F	CACA A RCAGGA Y ATCTTC
2F	GCSATGA A CTTC A RG
3F	ATGGT C GATAC S GGWAAC
1R	CGG MTT TGT TCA GGA A
2R	CGG TTC TTC TTY TTG TC
3R	TGC CGA TGA TGT CYT G

3.4.2 Pomnoževanje gena *traG* z verižno reakcijo s polimerazo

Izolirano genomsko DNA (pogl. 3.3) bakterije *P. bryantii* in *B. ovatus*, ki je služila za pozitivno kontrolo, smo poskusili pomnožiti z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s kombinacijami ZO: 1F-1R, 1F-2R, 1F-3R, 2F-2R, 2F-3R in 3F-3R v cikličnem termobloku MyCycler (BioRad, ZDA) z možnostjo gradiента temperature. Reakcijski mešanici (preglednica 5) smo dodali 1 µL matrične DNA, skupni volumen je znašal 25 µL. Vse reagente, razen ZO, smo pridobili od proizvajalca Thermo Fischer Scientific (ZDA). Gen *traG* smo pomnožili v 30 ciklih, razmere pri pomnoževanju so opisane v preglednici 6.

Preglednica 5: Sestava reakcijske mešanice pri pomnoževanju gena *traG*. Reakcijsko mešanico smo dopolnili z dH₂O do volumna 24 µL.

Table 5: PCR reaction mix for amplifications of *traG* gene. dH₂O was added to final volume of 24 µL.

Reagent	Končna koncentracija
pufer s KCl	1x
MgCl ₂	2mM
dNTP	200 µM
polimeraza DNA Taq	0,04 U/µL
ZO 1	0,2 µM
ZO 2	0,2 µM

Preglednica 6: Razmere pri pomnoževanju gena *traG*.

Table 6: Conditions of amplification of *traG* gene.

	T (°C)	t (min)
začetna denaturacija	94	5
denaturacija	94	0,5
homologno prileganje	40-59	0,5
podaljševanje	72	0,5/1,5*
končno podaljševanje	72	10

* Pri pomnoževanju z ZO 1F-3R in 2F-3R smo zaradi daljših pričakovanih produktov podaljšali čas z 0,5 na 1,5 min.

Uspešnost pomnoževanja *traG* smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (pogl. 3.4.3).

3.4.3 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost izolacije genomske DNA in pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo smo preverili z gelsko elektroforezo v gelu z vsebnostjo agaroze (SeaKem LE agarose, Cambrex Bio Science, ZDA) 0,7-0,9 %. Koncentracija agaroze v gelu je bila odvisna od pričakovane dolžine pomnožkov, to pa smo ocenili glede na velikost lestvice DNA GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific Inc., ZDA). Elektroforeza je potekala v 0,5 × pufru TBE pri napetosti 100 V. Pufer TBE smo pripravili v 5 × založni koncentraciji (preglednica 7) in ga redčili pred uporabo. Po končani elektroforezi smo gele 10 min barvali v raztopini etidijevega bromida (1 µg/mL) in razbarvali 10-20 min v destilirani vodi. Gele smo analizirali pri UV₃₀₂ s transiluminatorjem GelDoc 1000 (BioRad, ZDA) in nadgrajenim sistemom za zajemanje in obdelavo slike Molecular Analyst 1.4 (BioRad, ZDA).

Preglednica 7: Sestava 5 × pufra TBE.

Table 7: Composition of 5 × TBE buffer.

Sestavina	Koncentracija
tris (Merck, Nemčija)	54 g/L
borova kislina (Merck, Slovenija)	27,5 g/L
EDTA (Fluka, Švica)	2,92 g/L

3.4.4 Priprava kompetentnih celic

V 5 mL tekočega gojišča LB (preglednica 8) s streptomicinom (100 µg/mL) smo vcepili 30 µL celic bakterije *Escherichia coli* TOP10, ki smo jih inkubirali preko noči pri 37 °C ob stresanju v stresalnem inkubatorji pri 225 vrt./min (RVI-403, Tehnica, Slovenija). 0,5 mL prekonočne kulture celic TOP10 smo prenesli v 50 mL tekočega gojišča LB v 500 mL-erlenmajerici in jih inkubirali v stresalniku pri 37 °C ter 250-300 vrt./min. Ko je absorbanca kulture pri 600 nm dosegla vrednost 0,35-0,40, smo celice tretirali s CaCl₂ (Sambrook in Russell, 2001).

Preglednica 8: Sestava gojišča LB.

Table 8: Composition of LB medium.

Sestavina	Koncentracija
tripton (Liofilchem, Italija)	10 g/L
kvasni izvleček (Biolofe, Italija)	5 g/L
NaCl (Merck, Nemčija)	10 g/L

Najprej smo erlenmajerico za 10 min postavili na led, nato smo vsebino razdelili v dve centrifugirki in ju centrifugirali 10 min pri 2700 × g in 4 °C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Nemčija). Supernatant smo zavrgli, pelet resuspendirali v 7,5 mL hladnega CaCl₂ (Merck, Nemčija) in ga združili v eni centrifugirki. Vsebino smo zopet centrifugirali 10 min pri 2700 × g in 4 °C. Supernatant smo zavrgli in pelet resuspendirali v 2 ml hladnega 0,1 M CaCl₂ s 15 % glicerola. Suspenzijo celic smo razdelili v mikrocentrifugirke, ki smo jih za 5 min pomocili v predhodno ohlajen alkohol na temperaturo -70 °C, da so celice čim hitreje zamrznile, nato smo jih shranili pri -70 °C.

3.4.5 Kloniranje pomnožkov gena *traG*

Pomnožke gena *traG* pomnožene s kombinacijo ZO 1F-2R in 3F-3R smo očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija), pomnožke pomnožene z ZO 2F-3R pa smo zaradi prisotnosti nespecifičnih pomnožkov izrezali iz gela in očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Očiščene pomnožke smo nanesli na agarozni gel (pogl. 3.4.3) in ocenili njihovo koncentracijo s programom GeneTools (Synoptics Ltd.,

Velika Britanija) glede na znano koncentracijo lestvice DNA GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific Inc., ZDA) v gelu. Pomnožek pridobljen z ZO 2F-3R smo skoncentrirali v centrifugiji z vakuumsko črpalko.

Ligacijo smo izvedli s kompletom CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fischer Scientific Inc., ZDA) po protokolu Sticky-End Cloning Protocol. V ligacijsko mešanico smo dodali 50 ng vektorja in ~150 ng posameznega pomnožka, ker je to optimalno razmerje vektorja in inserta (1:3). Mešanico smo pri sobni temperaturi inkubirali 30 min, nato pa jo uporabili za transformacijo kompetentnih celic.

Zamrznjene kompetentne celice smo odtajali na ledu ter 50 µL kompetentnih celic dodali 5 µL ligacijske mešanice. Po 20 min inkubacije na ledu smo transformacijsko mešanico 1 min inkubirali v termobloku pri 42 °C. Po 2-3 min ponovne inkubacije na ledu smo dodali 400 µL tekočega gojišča LB in suspenzijo celic inkubirali 45 min pri 37 °C in 175 vrt./min.

Različne volumne transformacijske mešanice (50 µL, 100 µL, 150 µL) smo nanesli na agarske plošče LB Amp (2 % agarja), pripravljene iz gojišča LB z dodanim ampicilinom (100 µg/mL) in jih čez noč (16 h) inkubirali pri 37 °C. Zrasle kolonije smo prepikirali na novo trdno gojišče LB Amp, jih inkubirali čez noč pri 37°C, nato pa s PCR preverili ali vsebujejo insert prave dolžine. Reakcijsko mešanico smo pripravili kot je navedeno v navodilih proizvajalca, DNA pa pomnožili v 25 ciklih pri razmerah, opisanih v preglednici 9. V posamezno reakcijsko mešanico smo kot vir DNA dodali bakterijsko kolonijo.

Preglednica 9: Razmere pri PCR, s katerim smo preverili prisotnost inserta v kompetentnih celicah.

Table 9: Conditions of PCR for checking the presence of the insert in competent cells.

	T (°C)	t
začetna denaturacija	95	10min
denaturacija	94	45 s
homologno prileganje	60	45 s
podaljševanje	72	2 min
končno podaljševanje	72	15 min

3.4.6 Izolacija plazmidne DNA in sekvenciranje

Kolonije transformiranih celic smo precepili v 10 mL tekočega gojišča LB Amp, jih preko noči inkubirali pri 37 °C in stresanju pri 120 vrt./min, nato pa centrifugirali 10 min pri 3200 vrt./min. Plazmid smo izolirali s kompletom High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Ustrezno velikost (dolžina plazmida + dolžina pomnožka) in količino DNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (pogl. 3.4.3), pred tem pa plazmid linearizirali z restriktičnim encimom *Xba*I v pripadajočem pufru 10 × Tango Buffer z BSA (Thermo Fischer Scientific Inc.,

ZDA). Cepitev DNA je potekala v volumnu 10 µL 2h pri 37 °C v vodni kopeli. V reakcijsko mešanico s koncentracijo encima 0,5 U/µL in 1 × pufrom, ki smo jo dopolnili z dH₂O do 7 µL, smo dodali 3 µL izolirane plazmidne DNA. Plazmidno DNA, izolirano iz treh kolonij z istim pomnožkom, so po naših navodilih sekvencirali v podjetju Macrogen Inc. iz Koreje. Identiteto dobljenih sekvenc smo preverili z BLAST.

3.4.7 Bioinformacijska analiza hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB₁4

Z algoritmom BLASTX (Altschul in sod., 1997) smo v genomu *Bacteroides fragilis* YCH46 (AP006841.1) in transpozonu CTnBST (AY345595.2) iz *Bacteroides uniformis* WH207 poiskali gene, podobne zapisu v genomu seva B₁4 v širši okolici regije, za katero so Gorenc in sodelavci (2009) ugotovili, da je homologna genom BF2879-BF2884 v CTn3-Bf iz *B. fragilis*. Z orodjem BLASTX smo poiskali tudi gene iz drugih organizmov (baza nr), ki so podobni tistim v hipotetičnem konjugativnem transpozonu CTnB₁4. Dolžino in vsebnost GC homolognih regij smo ugotovili s programom Artemis (Rutherford in sod., 2000). Genom na hipotetičnem transpozonu CTnB₁4 smo pripisali funkcijo in jih razvrstili v skupine glede na procese v celici, pri katerih sodelujejo. Pri tem smo uporabili orodja: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>), UniProt (<http://www.uniprot.org/>), JCVI CMR (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/shared/RoleList.cgi>) in iHOP (<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>). Nukleotidne sekvence bralnih okvirjev regije GG (ORF1170-1189) smo z orodjem ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) prevedli v aminokislinske sekvence. Te smo uporabili za iskanje podobnih zadetkov (baza nr) z orodji PSI-BLAST (BLASTP), RPS-BLAST (Altschul in sod., 1997) in programom Phyre (Kelley in Sternberg, 2009).

3.5 ODPORNOST PROTI MONENZINU

3.5.1 Preizkus naravne odpornosti in adaptacija divjih sevov na rast ob prisotnosti monenzina

Preizkus naravne odpornosti bakterij proti monenzinu smo izvedli v 4 bioloških ponovitvah, v razponu koncentracije monenzina v gojišču 0-1 mM za seve *P. bryantii* B₁4, TC1-1, TF1-3, oziroma 0-50 µM za sev *P. ruminicola* 23. Predhodno smo preverili, da etanol v končni koncentraciji 2 % v gojišču ne vpliva na rast sevov 23 in B₁4. Monenzin (Monensin sodium salt 90-95 % (TLC), Sigma-Aldrich, ZDA) smo raztopili v 96 % etanolu, raztopino filtrirali skozi filter s premerom por 0,22 µm in jo shranili pri -20 °C.

Kulturo seva *Prevotella ruminicola* 23 smo adaptirali na monenzin tako, da smo jo postopoma precepljali v gojišče z naraščajočo koncentracijo monenzina: 7, 10, 16, 22, 50, 100, 150, 400, 800 µM in nazadnje 1 mM. Za nadaljnje delo smo uporabili adaptante, ki so rastle pri koncentraciji monenzina 10 µM (adaptanta 23-10) in 150 µM (adaptanta 23-150).

Adaptante seva 23 smo vedno gojili v prisotnosti koncentracije monenzina, na katero so bile adaptirane. Tudi kulture B₁₄, ki so zrastle pri koncentraciji monenzina 10 in 150 µM (adaptanti B₁₄-10 in B₁₄-150), smo vedno gojili v prisotnosti monenzina.

3.5.2 Ohranjanje odpornosti

Adaptirane seve smo gojili v gojišču M2 brez monenzina, prenose v sveže gojišče smo izvedli po 24-72 h. Občasno smo adaptante, ki smo jih gojili v gojišču brez monenzina, precepili v gojišče z ustrezno koncentracijo monenzina (23-10 in B₁₄-10: 10 µM, 23-150 in B₁₄-150: 150 µM), da smo preverili, ali še vedno rastejo v prisotnosti antibiotika. Kot kontrolo smo adaptante vzporedno gojili le v gojišču s koncentracijo monenzina 10 ali 150 µM in divje tipe sevov v gojišču brez monenzina.

3.5.3 Analiza hlapnih maščobnih kislin in plinskih produktov fermentacije

Ko so kulture glede na optično gostoto dosegle sredino logaritemske faze rasti, smo s plinskim kromatografom analizirali sestavo plinske faze, nato pa kulturo razdelili v mikrocentrifugirke po 1,4 mL in jih do analize shranili pri -20 °C . Eksperiment je bil opravljen dvakrat z dvema biološkima paralelkama.

3.5.3.1 Analiza kratkoverižnih MK

Kratkoverižne MK smo ekstrahirali iz supernatantov kultur z dvojno etrsko ekstrakcijo (Holdeman in sod., 1977). 1 mL supernatanta smo zakisali s 50% H₂SO₄, dodali 100 µL internega standarda in kislino ekstrahirali dvakrat zaporedoma, vsakič z 1 mL etra. Etrske fazi smo združili in jih posušili z granuliranim CaCl₂ (Merck, Nemčija). Etrske ekstrakte smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A (Shimadzu Corporation, Japonska) s plamensko-ionizacijskim detektorjem (FID) in kapilarno kolono DB-WAXetr 122-7332 (Agilent Technologies Inc., ZDA). Analiza je potekala pri temperaturnem programu od 90 °C (2 min) do 160 °C (končno temperaturo smo ohranjali 5 minut), s hitrostjo naraščanja temperature 15 °C na minuto. Temperatura injektorja je bila 160 °C, temperatura detektorja pa 200 °C. Kot nosilni plin smo uporabili helij (pretok 30 mL/min), kot detektorska plina pa vodik (pretok 30 mL/min) in zrak (pretok 300 mL/min). 1 µL vzorca smo injicirali v načinu split (1:100). Kot interni standard smo vzorcem dodali krotonsko kislino in kratkoverižne MK kvantificirali po metodi internega standarda na integratorju Chromatopac C-R6A. Za kalibracijo smo uporabili mešanico kratkoverižnih MK v sestavi: ocetna kislina (17,485 mM), propionska kislina (13,364 mM), izomaslena kislina (10,782 mM), n-maslena kislina (10,895 mM), izo-valerna kislina (9,109 mM), n-valerna kislina (9,207 mM), n-kapronska kislina (8,003 mM).

3.5.3.2 Analiza mlečne in jantarne kislino

Vzorce za analizo mlečne in jantarne kislino smo pripravili z metilacijo supernatantov kultur (Holdeman in sod., 1977). 1 mL supernatanta smo dodali 2 mL metanola in 0,4 mL 50% H₂SO₄ ter ga segrevali 30 minut pri 60 °C. Po dodatku 1 mL vode (miliQ) in 0,5 mL kloroformu smo zaprte epruvete stresali. Kloroformsko fazo smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A (Shimadzu Corporation, Japonska) z detektorjem FID in kapilarno kolono DB-WAXetr 122-7332 (Agilent Technologies Inc., ZDA). Analiza je potekala po temperaturnem programu od 95 °C do 144 °C (začetno temperaturo smo ohranjali 1 min, končno pa 3 min) s hitrostjo naraščanja temperature 9 °C na minuto. Temperatura injektorja je bila 145 °C in temperatura detektorja 200 °C. Nosilni in detektorski plini ter postopek kvantifikacije so bili enaki kot v poglavju 3.5.3.1. Za kalibracijo smo uporabili litijev laktat (5,208 mM) in jantarno kislino (4,234 mM).

3.5.3.3 Analiza plinskih fermentacijskih produktov

Delež H₂, N₂, CH₄ in CO₂ iz atmosfere nad gojiščem smo izračunali po analizi na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A (Shimadzu Corporation, Japonska) z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD) in kolono Porapak Q. Analiza je potekala izotermalno pri temperaturi 28 °C. Temperatura injektorja je bila 50 °C in temperatura detektorja 80 °C pri toku 60 mA. Kot nosilni plin smo uporabili argon s pretokom 25 mL/min. Vzorce smo pridobili tako, da smo s plinotesno brizgalko prebodli tesnilo Hungatove epruvete iz butilne gume, odvzeli 50 µL plina nad kulturo in ga analizirali. Rezultate smo kvantificirali po metodi eksternega standarda na integratorju Chromatopac C-R6A (Marinšek Logar, 1992). Standardna plinska mešanica za kalibracijo je vsebovala 14,92 % (vol.) vodika, 20,29 % (vol.) dušika, 20,12 % (vol.) metana in 44,92 % (vol.) ogljikovega dioksida. Kot ničelni vzorec smo analizirali atmosfero nad neinokuliranim inkubiranim gojiščem M2.

3.5.4 Analiza dolgoverižnih membranskih maščobnih kislin

Dolgoverižne membranske maščobne kislino divjih tipov in adaptant bakterij *P. bryantii* ter *P. ruminicola*, ki so rastle v gojišču s koncentracijo monenzina 10 µM in 150 µM, smo analizirali v logaritemski fazi rasti. Adaptanta 23-10 ob času analize zaradi težav pri poskusu adaptacije še ni bila pripravljena, zato ni vključena v analizo. Bakterijske kulture v dveh paralelkah smo izjemoma gojili v serumskih stekleničkah, volumen kulture je znašal 24 mL, da smo zagotovili dovolj celic za analizo. Pripravo vzorcev in analizo prisotnosti različnih dolgoverižnih maščobnih kislin v membranah smo izvedli v Zavodu za zdravstveno varstvo v Mariboru. Kulture smo iz serumskih stekleničk prelili v centrifugirke, jih centrifugirali 5 min pri 4000 RPM, odlili gojišče, celice sprali z 20 mL fiziološke raztopine ter zopet centrifugirali pri istih nastavitevah. Supernatant smo odlili in s plastično cepilno zanko dobro razmazali celice po spodnjem robu stene viale. Izolacijo

dolgorižnih maščobnih kislin smo izvedli s kompletom Q-FAME Rapid ID Kit (MIDI Inc., ZDA) po navodilih proizvajalca, nato pa jih analizirali s sistemom Sherlock Microbial ID System S/N 160417 (MIDI Inc., ZDA) po metodi IBA1. Analizo smo izvedli na plinskemu kromatografu 6850 GC (Agilent Technologies Inc., ZDA) z detektorjem FID in kolono Ultra 2 1901B-102E (Agilent Technologies Inc., ZDA). Temperatura injektorja je bila 250 °C in temperatura detektorja 300 °C. Kot nosilni plin smo uporabili dušik (pretok 30 mL/min), kot detektorska plina pa vodik (pretok 30 mL/min) in zrak (pretok 350 mL/min).

3.5.5 Analiza velikosti celic v prisotnosti in odsotnosti monenzina s presevnim elektronskim mikroskopom

Velikost celic divjih tipov in adaptiranih bakterij *P. bryantii* in *P. ruminicola* smo analizirali s presevno elektronsko mikroskopijo na Oddelku za Biologijo Biotehniške fakultete. Analizirali smo jih v sredini logaritemske faze rasti in v stacionarni fazi rasti, ki smo ju določili glede na optično gostoto. Točko v stacionarni fazi rasti smo definirali kot dvokratnik časa od začetka rasti do prehoda v stacionarno fazo. Eksperiment smo opravili v dveh bioloških ponovitvah. 1 mL primerno zrastlih kultur smo centrifugirali 4 min pri 4000 rpm, odlili supernatant, dodali 500 µL 0,1 M natrij fosfatnega pufra (pH 7,2), ki smo ga pripravili iz 68,4 % 1 M Na₂HPO₄ (Merck, Nemčija) in 31,6 % NaH₂PO₄ (Merck, Nemčija), in vzorce ponovno centrifugirali 4 min pri 400 rpm. Da bi kar najbolje odstranili ostanke gojišča, smo postopek spiranja z natrij fosfatnim pufrom ponovili dvakrat. Po zadnjem centrifugiranju smo celice resuspendirali v 500 µL 4 % paraformaldehyda. Raztopino paraformaldehyda (Merck, Nemčija), ki nikoli ni bila starejša od 24 h, smo pripravili v 0,1 M natrij fosfatnem pufru, jo segreli do 60 °C in dodali nekaj kapljic 5 M NaOH (Merck, Nemčija). Vzorce fiksirane s paraformaldehidom smo do analize shranili pri 4 °C v mikrocentrifugirkah, ovitih s parafilmom.

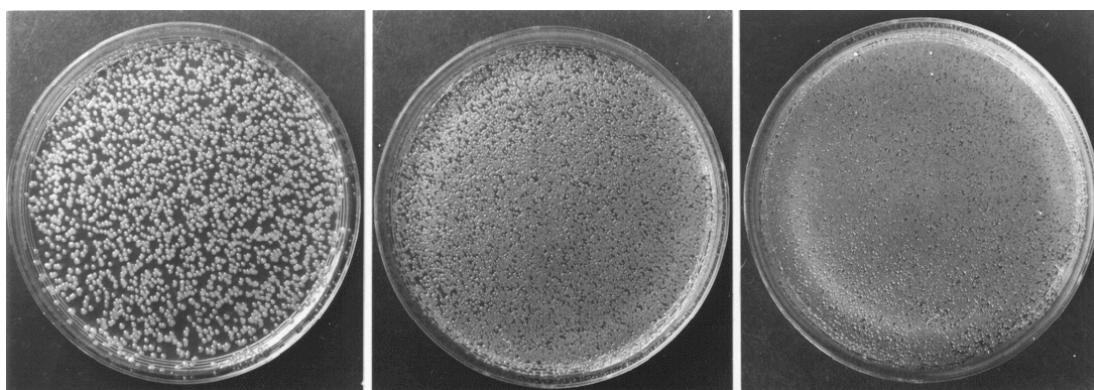
Pred mikroskopiranjem smo celice negativno kontrastirali z uranil-acetatom. 15 µL fiksirane bakterijske suspenzije smo nanesli na 3-milimetrsko bakreno mrežico (SPI, ZDA) prekrite s folijo Formvar (Agar Scientific, ZDA), in počakali 1-2 min. S filter papirjem smo popivnali odvečno suspenzijo celic in na mrežico nanesli kapljico 1-odstotne vodne raztopine uranil-acetata (CH₃COO)₂UO₂. Odvečno raztopino uranil-acetata smo po 10 s popivnali in mrežico posušili na zraku. Vzorce smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (CM 100, Philips, Nizozemska), nadgrajenim z digitalno kamero (Bioscan 792, Gatan Inc., ZDA) in programom za zajemanje in obdelavo slike (DigitalMicrograph 3.4.1, Gatan Inc., ZDA).

Fotografije preparatov smo analizirali v programu Image J (Abràmoff in sod., 2004). Izmerili smo širine in dolžine posameznih celic, združili podatke obeh ponovitev v enakem

obsegu in izvedli t-test, s katerim smo ovrednotili razlike v širini in dolžini celic ($< 0,05$) med različnimi kulturami v različnih rastnih fazah.

3.5.6 Odpornost proti antibiotikom

Trdno gojišče M2 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.2. Bakterijske kulture divjega tipa in adaptant iste vrste, stare 24 h, smo redčili z gojiščem M2, ki smo ga pripravili brez glukoze, celobioze in škroba. Kulture smo redčili do absorbance, pri kateri je bila gostota bakterijske rasti po 24-48 h primerna za testiranje odpornosti proti antibiotikom (slika 7). Za vrsto *P. bryantii* B₁₄ smo pripravili redčitev z absorbanco 0,060, za vrsto *P. ruminicola* 23 pa redčitev z absorbanco 0,270.



Slika 7: Idealna (sredina) in še sprejemljiva gostota bakterijske rasti (najmanjša gostota levo in največja gostota desno) na agarnih ploščah pri testiranju odpornosti proti antibiotikom (BSAC methods..., 2012).

Figure 7: Ideal (middle), lightest (left) and heaviest (right) acceptable bacterial growth on agar plates for antimicrobial susceptibility testing (BSAC methods..., 2012).

Na pripravljenе plošče smo v anaerobni komori s sterilno vatirano palčko razmazali 200 μL ustrezone redčitve bakterijske kulture, ki smo jih pripravili z gojiščem M2 brez dodanih sladkorjev. Ko so se plošče posušile, smo na površino položili antibiotske diske ali trakove, plošče pa zaprli v anaerobne lonce, ki smo jih prestavili iz anaerobne komore v inkubator s temperaturo 37 °C. Testirali smo odpornost bakterij proti različnim antibiotikom v obliki antibiotskih trakov z gradientom antibiotika (preglednica 10) ali v obliki antibiotskih diskov (preglednica11). Za kontrolo anaerobne atmosfere smo v anaerobne lonce dodali epruveto s poltrdnim gojiščem (pogl. 3.2), ki se ob prisotnosti kisika zaradi indikatorja resazurinaobarva rdeče. Po 48 h smo z merilom izmerili premer cone inhibicije okrog antibiotskih diskov in odčitali minimalno inhibitorno koncentracijo antibiotika s trakov. Eksperiment je bil izveden v dveh bioloških ponovitvah.

Preglednica 10: Imena, okrajšave, koncentracije in proizvajalci antibiotikov, ki smo jih v raziskavi uporabili v obliki trakov z gradientom antibiotikov.

Table 10: Names, abbreviations, concentrations and manufacturers of antibiotics used in our study in the form of strips with antibiotic gradient.

Antibiotik	Okrajšava	Koncentracija [µg/mL]	Proizvajalec
azitromicin	AZ	0,016-256	ABBiodisk, Švedska
benzilpenicilin	PG	0,002-32	ABBiodisk, Švedska
ceftazidim	TZ	0,016-256	ABBiodisk, Švedska
imipenem	IMI	0,002-32	Liofilchem, Italija
klaritromicin	CH	0,016-256	ABBiodisk, Švedska
klindamicin	CM	0,016-256	ABBiodisk, Švedska
levofloksacin	LE	0,002-32	ABBiodisk, Švedska
oksačilin	OX	0,016-256	ABBiodisk, Švedska
tetraciklin	TE	0,016-256	Liofilchem, Italija
vankomicin	VA	0,016-256	Liofilchem, Italija

Preglednica 11: Imena, okrajšave, količine in proizvajalci antibiotikov, ki smo jih v raziskavi uporabili v obliki diskov.

Table 11: Names, abbreviations, concentrations and manufacturers of antibiotics used in our study in the form of discs.

Antibiotik	Okrajšava	Količina [µg]	Proizvajalec
amoksicilin/ klavulanska kislina	AMC	30	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
ampicilin/sulbaktam	SAM	20	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
cefaklor	CEC	30	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
cefazolin	CZ	30	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
cefpodoksim	CPD	10	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
cefuroksim	CXM	30	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
ciprofloksacin	CIP	5	Oxoid, Velika Britanija
enrofloksacin	ENO	5	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
eritromicin	E	2	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
florfenikol	FFC	30	Oxoid, Velika Britanija
gentamicin	GM	10	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
kloramfenikol	C	30	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
metronidazol	MET	80	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
mupirocin	MUP	5	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
nitrofurantoin	F/M	300	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
norfloksacin	NOR	10	Oxoid, Velika Britanija
novobiocin	NB	5	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
penicilin	P	10	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
tobramicin	NN	10	Beckton, Dickinson and Company, ZDA
trimetoprim/sulfametoksazol	SXT	25	Oxoid, Velika Britanija

3.5.8 Sekvenciranje DNA in analiza genomskega sekvenca

Genomsko DNA divjih tipov obeh vrst ter monenzinskih adaptant 23-150 in B₁₄-150, ki smo jo izolirali po protokolu v poglavju 3.3, so na našo zahtevo sekvencirali v EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Nemčija) v dveh ponovitvah, prvič s tehnologijo Illumina MiSeq in drugič s tehnologijo HiSeq (paired end). Lastnosti so najprej ročno pregledali s programom FastQC 0.10.1 (FastQC, 2010), nato pa so s programom Trimmomatic 0.30 (Lohse in sod., 2012) iz odčitkov odstranili sekvene adapterjev Illumina in baze na koncih odčitkov, katerih kvaliteta je bila nižja od vrednosti 20. Odčitke, katerih 4-črkovna okna so imela povprečno vrednost kvalitete manjšo od 15, so obrezali, na koncu pa odstranili vse odčitke, krajše od 36 bp.

Sekvence iz posamezne knjižnice vsakega seva smo poravnali na sekvenco genoma iste vrste, shranjeno v bazi podatkov NCBI (referenčna genoma *P. ruminicola* 23 NC_014033.1, *P. bryantii* B₁₄ NZ_ADWO00000000.1), s programom BWA (Li in Durbin, 2009). Delež odčitkov, ki so se poravnali na referenčno sekvenco, smo ugotovili s programom SAMtools 1.0.19 (Li in sod., 2009), podatke o pokritosti referenčne sekvence pa smo pridobili s programom BEDTools 2.17.0 (Quinlan in Hall, 2010). S programom SAMtools smo prav tako združili podatke iz dveh knjižnic, odstranili podvojene sekvene ter poiskali razlike med referenčnimi in sekvenciranimi genomi. Dobljene razlike smo filtrirali glede na privzete kriterije v programu SAMtools, nato pa jih anotirali s programom SnpEff (Cingolani in sod., 2012). Med razlikami smo poiskali tiste, ki so značilne le za adaptirana seva in se ne pojavljajo v divjih tipih ter jih ročno pregledali v programu IGV (Thorvaldsdóttir in sod., 2013). Vse bioinformacijske analize smo izvedli v operacijskem sistemu Linux Ubuntu, v programu Terminal, podrobnejši opis metode in uporabljenih ukazov sledi v nadaljevanju.

Ker genomska sekvenca seva B₁₄ za razliko od genomske sekvence seva 23 ni zaključena, smo najprej vse genetske soseske v mapi NZ_ADWO00000000.scaffold.fna združili v eno datoteko, ki smo jo uporabili za pripravo indeksa:

*cat *.fna > ref.fna*

Priprava indeksa referenčne sekvence (ref.fa) iz baze NCBI za poravnavo z BWA:
bwa index ref.fa

Poravnavo pridobljenih odčitkov iz posamezne knjižnice (reads1_1.fq in reads2_1.fq iz prve ter reads1_2.fq in reads2_2.fq iz druge knjižnice) na referenčno sekvenco s programom BWA:

bwa mem ref.fa reads1_1.fq reads2_1.fq > lib1.sam
bwa mem ref.fa reads1_2.fq reads2_2.fq > lib2.sam

Pretvorba nastale datoteke datoteke vrste .sam (lib1.sam in lib2.sam) v vrsto .bam s programom SAMtools:

```
samtools view -b -S -o lib1.bam lib1.sam
samtools view -b -S -o lib2.bam lib2.sam
```

Sortiranje nastale datoteke vrste .bam (lib1.bam in lib2.bam) s programom SAMtools:

```
samtools sort lib1.bam lib1.sorted
samtools sort lib2.bam lib2.sorted
```

Indeksiranje nastale datoteke vrste .bam (lib1.sorted.bam in lib2.sorted.bam) s programom SAMtools, ki je nujno pred izvajanjem nekaterih drugih funkcij, med njimi tudi koraka v naslednji točki:

```
samtools index lib1.sorted.bam
samtools index lib2.sorted.bam
```

Pridobivanje statističnih podatkov o številu poravnanih odčitkov iz posamezne knjižnjice (lib1.sorted.bam in lib2.sorted.bam) na ustrezeno referečno sekvenco in zapisovanje podatkov v tekstovno datoteko vrste .txt:

```
samtools flagstat lib1.sorted.bam > lib1.sorted.flagstat.txt
samtools flagstat lib2.sorted.bam > lib2.sorted.flagstat.txt
```

Združevanje odčitkov posameznega seva iz obeh knjižnic v sortiranih datotekah (lib1.sorted.bam in lib2.sorted.bam) s programom SAMtools:

```
samtools merge strain.bam lib1.sorted.bam lib2.sorted.bam
```

Pridobivanje podatkov o pokritosti referenčne sekvence z odčitki s programom BEDTools in zapisovanje podatkov v tekstovno datoteko vrste .txt:

```
bedtools genomecov -ibam strain.bam -bg > strain.cov.txt
```

V datoteki strain.cov.txt so zbrani podatki o pokritosti posameznih nukleotidnih mest referenčnega genoma. V nadaljevanju nas je zanimalo, kakšen delež referenčne sekvence ni pokrit z nobenim odčitkom in kakšna je povprečna pokritost mest, na katere se je poravnal najmanj eden.

Izpis regij referenčne sekvence iz nastale datoteke strain.cov.txt, na katere se ni poravnal noben odčitek in imajo zato pokritost enako vrednosti 0:

```
grep -w 0$ strain.cov.txt > strain.cov0.txt
```

Seštevek nukleotidnih mest izpisanih regij smo delili s številom nukleotidnih mest v genomu in tako izračunali delež genoma, ki ni bil pokrit z nobenim odčitkom.

Da bi lahko izračunali pokritost nukleotidnih mest referenčne sekvence, na katere se je poravnal najmanj en odčitek, smo morali najprej iz podatkov odstraniti regije, ki niso bile pokrite. Zapis regij, na katere se je poravnal najmanj en odčitek, v novo datoteko:

```
grep -v -w 0$ strain.sorted.cov.txt > strain.sorted.cov-0.txt
```

V prvem koraku smo iz podatkov v datoteki strain.sorted.cov-0.txt izračunali število baz, ki smo jih pridobili v procesu sekvenciranja in so bile uporabljene pri poravnavi na referenčno sekvenco. Dolžino regij z določeno pokritostjo smo množili z vrednostjo pokritosti, delne rezultate pa nato sešteli. Rezultat iz prvega koraka smo delili s seštevkom vseh nukleotidnih mest v datoteki strain.sorted.cov-0.txt in tako dobili povprečno pokritost nukleotidnih mest v referenčnem genomu, na katere se je poravnal najmanj en odčitek.

Izračun baz, pridobljenih v procesu sekvenciranja in poravnanih na referenčno sekvenco:

```
awk '{print ($3-$2)*$4}' strain.sorted.cov-0.txt > strain.cov-0.izraz.txt
paste -sd+ strain.cov-0.izraz.txt / bc > strain.cov-0.result.txt
```

Izračun vseh nukleotidnih mest v datoteki strain.sorted.cov-0.txt:

```
awk '{print $3-$2}' strain.sorted.cov-0.txt > strain.cov-0.regija.txt
paste -sd+ strain.cov-0.regija.txt / bc >> strain.cov-0.result.txt
```

Prvo število, zapisano v datoteki strain.cov-0.result.txt, smo delili z drugim in dobili povprečno pokritost nukleotidnih mest v referenčnem genomu, na katere se je poravnal vsaj en odčitek. Nadaljevali smo z iskanjem in karakterizacijo razlik med referenčnima in sekvenciranimi genomi.

Odstranjevanje podvojenih odčitkov iz datoteke strain.bam s programom SAMtools:

```
samtools rmdup strain.bam strain.rmdup.bam
```

Iskanje genetskih razlik med sekvenciranim (strain.rmdup.bam) in referenčnim (ref.fa) genomom ter prikaz razlik v datoteki vrste .vcf s programom SAMtools:

```
samtools mpileup -u -f ref.fa strain.rmdup.bam | bcftools view -v -c - > strain.raw.vcf
```

Filtriranje genetskih razlik v nastali datoteki (strain.raw.vcf) glede na privzete nastavitev s programom SAMtools:

```
vcfutils.pl varFilter strain.raw.vcf > strain.flt.vcf
```

Štetje genetskih razlik (vrstic, ki ne vsebujejo znaka #) v nastali datoteki vrste .vcf (strain.flt.vcf) z ukazom v programu Terminal:

```
grep -v '#' strain.flt.vcf / wc -l
```

Za anotacijo genetskih razlik s programom SNPEff je potrebno najprej naložiti bazo za ustrezni genom (npr. NC_014033.1 za *P. ruminicola* 23, imena vseh pripravljenih baz so zbrana v datoteki.snpEff.config). To smo storili v mapi SNPEff z ukazom:

```
java -jar.snpEff.jar download -v NC_014033.1
```

Pred anotacijo je potrebno preveriti ali je ime genoma oz. ali so imena genetskih sosesk v naloženi bazi enaka kot v datoteki vrste .vcf. V nasprotnem primeru jih je potrebno v datoteki vrste .vcf prilagoditi, tako da ustrezajo imenom v bazi, ki se izpišejo ob izvedbi ukaza za anotacijo genetskih razlik v naslednjem koraku. Eden izmed načinov, kako izraz A v datoteki (strain.flt.vcf) zamenjamo z izrazom B in to zapišemo v novo datoteko (strain.flt.name.vcf), je:

```
sed 's/A/B/g' strain.flt.vcf > strain.flt.name.vcf
```

Anotacija filtriranih genetskih razlik (strain.flt.name.vcf) s programom SNPEff glede na bazo NC_014033.1:

```
java -jar /pot/do/datoteke/snpEff.jar -c /pot/do/datoteke/snpEff.config -v -ud 0 NC_014033.1 strain.flt.name.vcf > strain.snpEff.vcf
```

Pimerjali smo genetske razlike divjega tipa in adaptante v datotekah vrste .vcf (strain.snpEff.vcf). Za ta namen smo uporabili skript, ki nam ga je prijazno poslal Marcus Fritz iz EMBL v Heidelbergu. Če je ime genetske soseske in nukleotidno mesto v genetski soseski ali genomu, kjer se pojavlja genetska razlika, enako pri divjem tipu in adaptanti, potem se genetski razliki pripše oznaka SHARED. Če je genetska razlika prisotna le v prvi datoteki, navedeni za primerjavo, se ji pripše oznaka D1ONLY, če je prisotna le v drugi datoteki pa D2ONLY. Ker skript preveri le ime genetske soseske oz. genoma in nukleotidno mesto, na katerem se nahaja genetska razlika, smo med tistimi z oznako SHARED pregledali še tip mutacije za primer, če bi se na istem mestu v različnih genomih zgodili različni mutaciji. Genetske razlike, ki so bile prisotne le v genomu adaptante smo ročno pregledali v programu IGV. Izločili smo tiste, ki so se kljub predhodni bioinformacijski analizi pojavljaje tako v genomu divjega tipa in adaptante, ter tiste, ki so se nahajale v območju negotove poravnave (mapping quality = 0). V bazah NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) in KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) smo poiskali funkcijo genov, v katerih smo odkrili razlike, značilne le za monenzinske adaptante.

4 REZULTATI

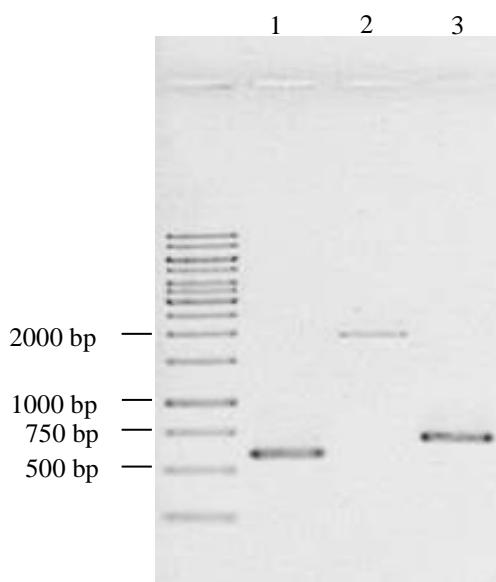
4.1 MOBILNI GENETSKI ELEMENTI

Rezultati predhodnih raziskav (Gorenc in sod., 2009) so pokazali, da je nekaj genov bakterije *P. bryantii* B₁₄, katere genom ni bil znan, podobnih genom na konjugativnem transpozonu CTn3-Bf seva *B. fragilis* YCH46. Odločili smo se raziskati, ali *P. bryantii* B₁₄ vsebuje konjugativni transpozon in ali je morebitni konjugativni transpozon podoben CTn3-Bf.

4.1.1 Pomnoževanje gena *traG* z verižno reakcijo s polimerazo

Da bi preverili, ali je v genomu *P. bryantii* B₁₄ prisoten gen *traG*, ki sodi med najbolj ohranjenie gene regije *tra*, potrebne za prenos transpozona, smo najprej z bioinformacijskim orodjem BLAST v ustreznih bazah podatkov poiskali gene, podobne genu *traG* v konjugativnem transpozonu CTn3-Bf bakterije *B. fragilis*. Najbolj podoben mu je bil gen iz konjugativnega transpozona CTnBST, odkritega v bakteriji *Bacteroides uniformis* WH207 (Gupta in sod., 2003). Na podlagi analize sekvenc gena *traG* iz *B. fragilis* in njemu podobnih genov iz baz podatkov, smo pripravili degenerirane ZO, s katerimi smo pomnožili DNA iz seva B₁₄. Iz nabora ZO smo izbrali 6 ZO (po 3 za pomnoževanje DNA v vsako smer), ki smo jih med seboj kombinirali glede na lastnosti in dolžino pričakovanega pomnožka.

DNA iz organizma *P. bryantii* B₁₄ smo uspeli pomnožiti s tremi kombinacijami ZO: 1F-2R, 2F-3R, 3F-3R (slika 8). Pri pomnoževanju s kombinacijo ZO 1F-2R smo dobili pomnožek, ki ustreza pričakovani dolžini 589 bp, pri kombinaciji ZO 2F-3R pa pomnožek, ki je daljši (~2000 bp) od pričakovane dolžine 1686 bp. Pričakovane dolžine smo izračunali glede na mesto naleganja ZO na gen *traG* (BF 2779) bakterije *B. fragilis* YCH46. Najvišja temperatura, pri kateri smo zaznali oba pomnožka, je bila 50 °C, več nespecifičnih produktov se je pojavljalo pri drugi kombinaciji ZO. Pomnožek, pomnožen s kombinacijo ZO 3F-3R je bil krajši (~750 bp) od pričakovane dolžine 855 bp in se je uspešno pomnožil tudi pri temperaturi 59 °C. Ker v naši zbirki nismo imeli seva *B. fragilis* YCH46, smo kot pozitivno kontrolo uporabili DNA bakterije *B. ovatus*, katere sekvenco smo prav tako uporabili pri načrtovanju ZO. Vsi pomnožki pozitivne kontrole so bili pričakovanih dolžin.



Slika 8: Očiščeni pomnožki gena *traG* v agaroznem gelu, pomnoženi s kombinacijami ZO 1F-2R (1), 2F-3R (2) in 3F-3R (3).

Figure 8: Purified PCR products of *traG* amplification in agarose gel, amplified with primer pairs 1F-2R (1), 2F-3R (2) in 3F-3R (3).

4.1.2 Kloniranje pomnožkov gena *traG*

Na vseh agarnih ploščah LB Amp, na katere smo nanesli transformacijsko mešanico, so bile prisotne kolonije. Manjše število kolonij v primerjavi z ostalimi ploščami je bilo prisotno na ploščah s transformantami, pri pripravi katerih smo pomnožke (kombinacija ZO 2F-3R) koncentrirali. Na ploščah s 50 µL inokuluma je zrastlo 92 (pomnožek z ZO 2F-3R), 336 (1F-2R) in 607 (3F-3R) kolonij.

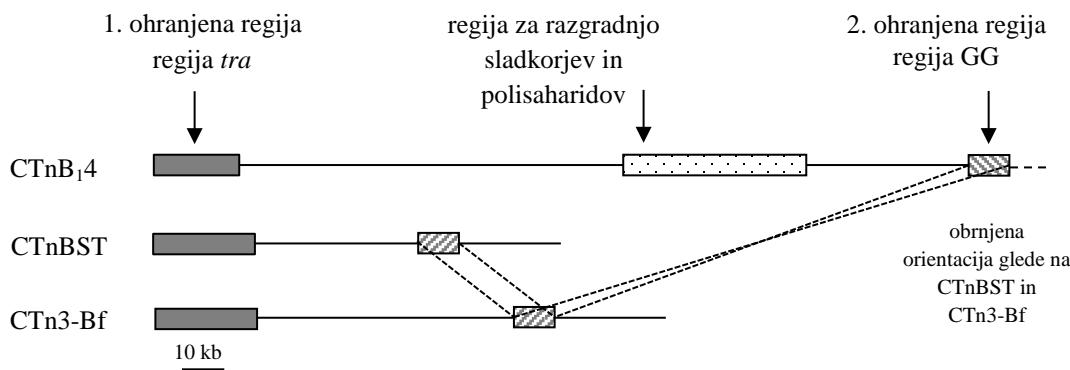
4.1.3 Sekvenciranje in anotacija pomnožkov gena *traG*

Plazmide iz treh kolonij s posameznim pomnožkom so na našo zahtevo sekvencirali v podjetju Macrogen iz Koreje. V istem času so na institutu JCVI objavili genomske sekvence *P. bryantii* B₁4. Z orodjem BLAST smo poiskali najbolj podobne sekvene v bazi podatkov. Pomnožkom pomnoženim z ZO 1F-2R in 3F-3R je bila pričakovana najbolj podobna sekvenca gena PBR_1339 iz genoma *P. bryantii* B₁4, pomnožku pomnoženemu z ZO 2F-3R pa je bila najbolj podobna sekvenca gena za nitrogenazo iste vrste. Zaradi degeneriranosti ZO in nižje temperature naleganja ZO, kar vodi do manjše specifičnosti, se je v PCR pomnožila druga sekvenca, ne pa sekvenca gena *traG*.

4.1.4 Opis hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB₁₄

Sočasno, ko smo z eksperimenti potrdili prisotnost gena *traG* v genomu *P. bryantii* B₁₄, je bila na spletu (FibRumBa database: <http://www.jcvi.org/rumenomics>) objavljena sekvenca genoma *P. bryantii* B₁₄. Ker pridobivanje sekvence iskanega konjugativnega transpozona ni bilo več smiselno, smo prešli na analizo razpoložljive genomske sekvene. Genomska sekvenca seva B₁₄ kasneje ni bila več dostopna na omenjeni internetni strani, objavljena pa je bila v podatkovni bazi NCBI, vendar s spremenjeno anotacijo genov. Ker bi bila ponovna bioinformacijska karakterizacija hipotetičnega konjugativnega transpozona časovno preobsežna, navajamo rezultate, pridobljene s prvotnimi genomskimi podatki. V nadaljevanju, na slikah 10 in 11, pa za primerjavo navajamo tudi gene sedaj dostopnega genoma *P. bryantii* B₁₄, označene s PBR_xxxx, ki so homologni genom opisanega konjugativnega transpozona CTnBST.

Z algoritmom BLASTX smo v sekvenkah konjugativnih transpozonov CTnBST in CTn3-Bf iz dveh vrst rodu *Bacteroides* poiskali gene, podobne tistim v *P. bryantii* B₁₄, ki ležijo v ter med regijama *tra* in GG. Vsem trem elementom sta namreč skupni dve regiji, v katerih je vrstni red genov ohranjen (slika 9). V prvi ohranjeni regiji (regija *tra*) so proteini, potrebni za prenos transpozona, v drugi (regija GG) pa večinoma hipotetični proteini. Regija *tra* vključuje gene, ki kodirajo protein za izrez konjugativnega transpozona iz kromosoma, mobilizacijske proteine, ki so odgovorni za tvorbo relaksosoma na mestu *oriT* in mobilizacijo drugih elementov, proteine Tra, ki tvorijo fizično povezavo med celicama, preko katere se prenese enoverižna DNA in integrizo, ki vgradi konjugativni transpozon v kromosom recipienta (Salyers in sod., 1995a). Regijo GG smo poimenovali po Gregorju Gorencu, ki je odkril, da so nekateri geni na tem področju genoma *P. bryantii* B₁₄ najverjetneje del konjugativnega transpozona (Gorenc in sod., 2009). Vloge regije GG ne poznamo, sestavlja jo primaza DNA, protein iz superdružine Fic, peptidazi, membranski protein in hipotetični proteini. Regija GG v *P. bryantii* obsega 13 bralnih okvirjev, medtem ko jih regija *tra* obsega 22 ORF. Z izjemo omenjenih regij ni podobnosti med hipotetičnim transpozonom v sevu B₁₄, ki smo ga poimenovali CTnB₁₄, in CTnBST ali CTn3-Bf iz vrst iz rodu *Bacteroides*.



Slika 9: Shematski prikaz lege ohranjenih regij v konjugativnih transpozonih CTnB₁₄, CTnBST in CTn3-Bf ter polisaharidne regije seva B₁₄ (Gorenc in sod., 2012).

Figure 9: Schematic representation of conserved regions of CTnB₁₄, CTnBST, CTn3-Bf and position of polysaccharide region of CTnB₁₄ (Gorenc in sod., 2012).

Primerjali smo dolžino in vsebnost GC genomov omenjenih bakterij, njihovih konjugativnih transpozonov in ohranjenih regij (preglednica 12). Hipotetični CTnB₁₄ je precej daljši in ima nižjo vsebnost GC v ohranjenih regijah ter v celotnem transpozonusu (območje, ki zajema obe ohranjeni regiji) kot konjugativna transpozona CTnBST in CTn3-Bf. Povprečna vsebnost GC CTnB₁₄ in genoma *P. bryantii* se ne razlikuje, v ohranjenih regijah pa je višja, kar opazimo tudi pri drugih dveh konjugativnih transpozoni. Dolžina regije GG se med konjugativnimi transpozoni ne razlikuje bistveno, regija *tra* CTnB₁₄ pa je malo krajsa kot homologni regiji v CTnBST in CTn3-Bf.

Preglednica 12: Primerjava dolžin in vsebnosti GC v genomih, konjugativnih transpozonih in ohranjenih regijah pri bakterijah *P. bryantii* B₁₄, *B. fragilis* YCH46 in *B. uniformis* WH207.

Tabel 12: Length and GC comparison of genomes, conjugative transposons and conserved regions of *P. bryantii* B₁₄, *B. fragilis* YCH46 in *B. uniformis* WH207.

Regija (obseg ORF v CTnB ₁₄)	<i>P. bryantii</i> B ₁₄ (CTnB ₁₄)		<i>B. fragilis</i> YCH46 (CTn3-Bf)		<i>B. uniformis</i> WH207 (CTnBST)	
	bp	% GC	bp	% GC	bp	% GC
genom	3.139.686	40,0	5.277.274	43,26	ni sekvenciran	
transpozon (ORF1177-1353)	211.619	40,0	125.778	45,4	100.903	47,5
regija GG (ORF1177-1189)	9.833	45,9	10.678	48,1	9.194	53,2
regija <i>tra</i> (ORF1332-1353)	21.044	42,2	25.188	46,8	24.842	51,7

V regiji *tra* konjugativnega transpozona CTnB₁₄ ni homologov devetih genov, ki so prisotni v CTnBST, medtem ko v regiji *tra* konjugativnega transpozona CTnBST ni homologa enega gena, ki je prisoten v CTnB₁₄ (slika 10). Geni CTnBST, katerih homologi

se v CTnB₁4 ne pojavljajo, kodirajo podenoto alfa polimeraze RNA (RpoA), metilazo DNA, produkti večine pa so hipotetični proteini, za katere ne vemo, ali so pomembni za prenos konjugativnega transpozona.

Produkti genov	CTnBST bst0xx	CTn3-Bf BF_xxxx	CTnB ₁ 4 ORFxxxx	CTnB ₁ 4 PBR_xxxx
integraza	1	2788	1353	1348
HP			1352	1347
HP	2	2789	1351	1346
protein za izrez	3	2790	1350	1345
HP	4	2791	1349	1344
TraP	5	2792	1348	1343
HP	6	2793	1347	
TraE	7	2794	1346	1342
TraE	8	2795	1345	1341
TraF	9	2796	1344	1340
TraG	10	2797	1343	1339
RpoA	11	2798		
HP	12	2799	1342	1338
HP	13	2800	1341	1337
HP		2801		
HP	14	2802	1340	1336
TraP	15	2803	1339	1335
HP	16	2804		
TraK	17	2805	1338	1334
HP	18	2806	1337	1333
HP		2807		
TraM	19	2808	1336	1332
HP	20	2809		
metilaza dna	21	2810		
TraN	22	2811	1335	1331
HP	23	2812	1334	1330
HP	24	2813	1333	1329
HP	25			
HP	26	2814		
protein za mobilizacijo	27	2815	1332	1328

Slika 10: Homolognost in ohranjenost zaporedja genov regije *tra* konjugativnih transpozonov CTn3-Bf in CTnB₁4 glede na CTnBST. Številke predstavljajo zaporedni bralni okvir v genomu. Obarvani geni CTn3-Bf in CTnB₁4 so homologni genom CTnBST ($I>28\%$), gen BF_2801 je homologen bst021 (temno siva), vendar ne sledi zaporedju genov. Geni prvotno dostopnega genoma B₁4 so označeni z ORFxxxx, geni sedaj dostopnega genoma B₁4 v bazi NCBI pa s PBR_xxxx. Kratka HP označuje hipotetične proteine.

Figure 10: Homology of CTn3-Bf and CTnB₁4 according to CTnBST *tra* region. Numbers represent successive open reading frames in the genome. Coloured CTn3-Bf and CTnB₁4 genes are homologous to CTnBST genes ($I>28\%$), bst021 is homologous to BF_2801 (dark grey), which does not follow the same order as genes in CTnBST. Genes assigned ORFxxxx originate from first published B₁4 genome data, genes

assigned PBR_xxxx originate from now accessible B₁4 genome in NCBI database. HP designates hypothetical proteins.

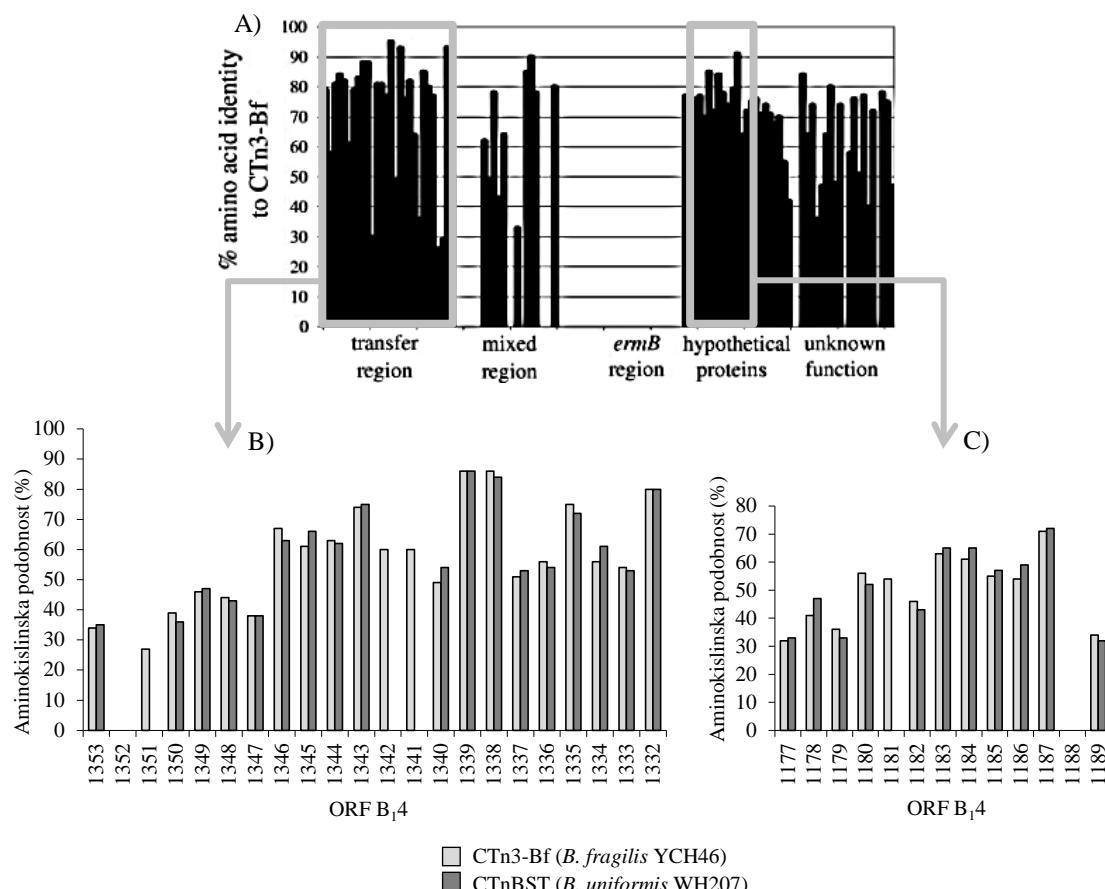
V regiji GG CTnB₁4 gen ORF1188, ki kodira protein iz družine Fic, nima homologov v regijah GG iz CTnBST in CTn3-Bf (slika 11). Nasprotno v sevu B₁4 ni genov, ki bi bili homologni primazi DNA, ki jo kodira bst082 in genu bst080, vendar je ta anotiran le kot hipotetični protein, zato ne poznamo njegove vloge. Hipotetičnim proteinom v regiji GG seva B₁4 smo glede na podobnost drugim sekvencam pripisali funkcijo, ki je navedena na sliki 11.

Produkti genov	CTnBST bst0xx	CTn3-Bf BF_xxxx	CTnB ₁ 4 ORFxxxx	CTnB ₁ 4 PBR_xxxx
peptidaza iz družine 23	78	2873	1177	1177
HP	79	2874	1178	1178
HP	80	2875	1179	
HP	81	2876	1180	
primaza DNA	82	2877	1181	
membranski protein	83	2878	1182	
HP	84	2879	1183	
HP	85	2880	1184	
HP	86	2881	1185	
peptidaza iz družine 23	87	2882	1186	
HP	88	2883	1187	
protein iz superdružine Fic	89	2884	1188	1188
HP				

Slika 11: Homolognost in ohranjenost zaporedja genov regije GG konjugativnih transpozonov CTn3-Bf in CTnB₁4 glede na CTnBST. Številke predstavljajo zaporedni bralni okvir v genomu. Obarvani geni CTn3-Bf in CTnB₁4 so homologni genom CTnBST ($I>32\%$) in imajo ohranjeno zaporedje. Geni prvotno dostopnega genoma B₁4 so označeni z ORFxxxx, geni sedaj dostopnega genoma B₁4 v bazi NCBI pa s PBR_xxxx. Kratika HP označuje hipotetične proteine.

Figure 11: Homology of CTn3-Bf and CTnB₁4 according to CTnBST GG region. Numbers represent successive open reading frames in the genome. Coloured CTn3-Bf and CTnB₁4 genes are homologous to CTnBST genes ($I>32\%$). Genes assigned ORFxxxx originate from first published B₁4 genome data, genes assigned PBR_xxxx originate from now accessible B₁4 genome in NCBI database. HP designates hypothetical proteins.

Z bioinformacijskim orodjem BLAST smo primerjali aminokislinsko podobnost bralnih okvirjev v ohranjenih regijah konjugativnih transpozonov CTnBST, CTn3-Bf s tistimi v regijah CTnB₁4. V povprečni aminokislinski podobnosti genov *tra* (57,4 %, 59,0 %) in regije GG (50,3 %, 50,9 %) iz CTnB₁4 v primerjavi z ohranjenima regijama v CTn3-Bf ali CTnBST ni večjih razlik (slika 12). Aminokislinska podobnost genov CTnB₁4 v regiji *tra* je za 7,1 % oziroma 8,1 % večja kot podobnost genov v regiji GG CTn3-Bf oziroma CTnBST.



Slika 12: A) Primerjava aminokislinske podobnosti CTn3-Bf in CTnBST (Schlesinger et al., 2007). Primerjava aminokislinske podobnosti B) regije tra in C) regije GG konjugativnih transpozonov CTn3-Bf (svetlo siva) in CTnBST (temno siva) s homolognima regijama v CTnB₁4.

Figure 12: A) Comparison of aminoacid identity of CTnBST to CTn3-Bf (Schlesinger et al., 2007). Comparison of aminoacid identity of B) tra region and C) GG region of CTn3-Bf (light grey) and CTnBST (dark grey) to regions of CTnB₁4.

Ker nas je zanimalo, ali se regiji *tra* in *GG* pojavljata tudi v drugih organizmih, smo poiskali homologne gene ohranjenih regij B₁4 v razpoložljivih bakterijskih genomih v bazi NCBI. Ob zadnjem preverjanju rezultatov je bila celotna regija *GG* ohranjena v 34 genomih, regija *tra* pa v 31 genomih bakteroidet, v katerih je bil ohranjen tudi vrstni red genov. Poleg genomov bakterij iz rodu *Bacteroides* smo med zadeki odkrili tudi genoma bakterij iz rodu *Alistipes* in *Parabacteroides*, ki prav tako sodita v deblo *Bacteroidetes*. Pri prevotelah se sicer tudi pojavljajo homologni geni, vendar ne v celotnih regijah; pri nekaterih vrstah je ohranjen le gen ali dva, pri drugih pa do tričetrt regije (*P. amnii*, *P. buccae*, *P. oris*). Število genov med ohranjenima regijama je v preučenih bakterijskih vrstah zelo različno (6-1262). Na spletni strani EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/genomes/wgs.html>) smo poiskali genomske sekvene organizmov, pri katerih smo odkrili obe ohranjeni regiji in določili dolžino odseka genoma, ki zajema

regiji *tra* in GG. V času analize smo lahko določili dolžino omenjenega odseka v vrstah *Bacteroides eggerthii* (61.890 bp), *Bacteroides ovatus* (53.340 bp) in *Bacteroides plebeius* (45.026 bp). Regiji *tra* (23,4-26,5 kb) in GG (10,4-12 kb) v treh omenjenih vrstah *Bacteroides* sta približno tako dolgi kot v CTnBST, CTn3-Bf in CTnBST. Prav tako je v genomih *B. eggerthii*, *B. ovatus* in *B. plebeius* vsebnost GC v regiji GG (~54%) višja kot v regiji *tra* (~51%). Vsebnost GC v odseku genoma, ki zajema obe regiji, je 50-51,4 %, v delu genoma, ki smo ga lahko uporabili za analizo (genomi niso bili zaključeni, dostopni so bili v bazi WGS), pa 42-47 %. Tudi glede na hipotetične transpozone v *B. eggerthii*, *B. plebeius* in *B. ovatus* je regija GG v sevu B₁4 obrnjena v nasprotno smer.

Hipotetični transpozon CTnB₁4 ima 178 bralnih okvirjev (ORF1177-ORF1353), od katerih jih ima 120 pripisano funkcijo. Razvrstili smo jih glede na procese v celici, v katerih so udeleženi (preglednica 13).

Preglednica 13: Delež genov hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB₁4, ki sodelujejo pri različnih celičnih procesih.

Table 13: Shares of genes on the hypothetical conjugative transposon CTnB₁4, which participate in different cell processes.

Funkcija	Delež
hipotetični proteini	33,5%
metabolizem sladkorjev in polisaharidov	15,6%
pripisana le osnovna funkcija	8,7%
transport in vezavni proteini	8,1%
prenos ctn	5,8%
transkripcija in popravljanje	5,8%
translacija	3,5%
posttranslacijske modifikacije	3,5%
sinteza aminokislin	3,5%
metabolizem maščob	2,3%
odziv na stres	2,3%
metilacijsko-restrikcijski sistem	1,7%
metabolizem nukleotidov	1,7%
metabolizem koencimov	1,7%
elektronska transportna veriga	1,7%
signalna transdukcija	0,6%

Najštevilčnejšo skupino genov na CTnB₁4 s pripisano funkcijo predstavljajo geni vpleteni v metabolizem sladkorjev in polisaharidov. V strnjenem zaporedju med regijama *tra* in GG leži velik delež genov iz omenjene skupine. Zaporedje 21 genov (ORF1220-ORF1240 oz. PBR_1218-PBR_1237) smo poimenovali »regija za razgradnjo sladkorjev in polisaharidov« (slika 9). Za vse hipotetične proteine iz omenjene regije, razen ORF1234,

smo s primerjalno bioinformacijsko analizo pokazali, da sodelujejo pri metabolizmu sladkorjev ali polisaharidov: ORF1226 kodira β -N-acetilheksozaminidazo, ORF1228 manozidazo, ORF1230 acetil-ksilan-esterazo, ORF1232 pa ramnozidazo. Produkt gena ORF1234 naj bi bil hipotetični protein, z nobenim od uporabljenih orodij za anotacijo pa nismo odkrili signifikantnih zadetkov. Glede na to, da ORF1233 in ORF1235, ki obdajata ORF1234, oba kodirata ramnogalakturonan-liazo in sta običajno najbolj podobna istemu genu v genomih drugih organizmov, kot je razvidno iz preglednice 14, smo sklepali, da je prišlo do preureditve genskega materiala v sevu B₁₄. Gena ORF1233 in ORF1235 bi lahko bila paraloga ali pa bi predstavljala en gen, v katerega se je vstavil ORF1234. Rezultati poravnave genov ORF1233 in ORF1235 z orodjem BLAST so pokazali, da si nukleotidni sekvenci genov nista podobni, aminokislinski sekvenci pa sta si podobni v več krajših regijah. Zaradi tega in različne dolžine genov sklepamo, da gena nista paraloga. S poravnavo genov ORF1233 in ORF1235 z geni iz vrst *Bacteroides* smo izključili možnost, da bi tvorila en gen, saj sta oba podobna istemu delu homolognih genov. Gen ORF1234 v novejši različici anotacije genoma *P. bryantii* B₁₄ ni prepoznan kot bralni okvir. Genom *B. fragilis* YCH46 in konjugativni transpozon CTnBST imata le posamezne homologe genov iz polisaharidne regije CTnB₁₄. Homologi genov polisaharidne regije CTnB₁₄ so prisotni tudi pri nekaterih drugih organizmih, pretežno v vrstah iz rodu *Bacteroides* (preglednica 14), pa tudi v bakteriji *Prevotella buccae*. Večinoma so prisotni v več sklopih, ki jih sestavlja 2-9 genov. Homologi genov ORF1237 in ORF1238, ki kodirata proteina SusC in SusD, so ohranjeni tudi v drugih organizmih, kjer se prav tako pojavlja skupaj, eden za drugim. V genomih organizmov, ki so imeli ohranjeni tudi regiji *tra* in GG (npr. *B. dorei*, *B. eggerthii* in *B. ovatus*), geni za metabolizem sladkorjev in polisaharidov ne ležijo med njima.

Preglednica 14: Primeri genov iz nekaterih drugih bakterij, ki so homologni ($I>30\%$) regiji za razgradnjo sladkorjev in polisaharidov v CTnB₁₄. Številke označujejo zaporedne bralne okvirje v genomu. Homologni geni se v drugih vrstah ne nahajajo v strnjeni regiji, ampak v več skupinah genov, v katerih si geni zaporedno sledijo z manjšimi presledki. Takšne skupine genov razmejuje črtkana črta.

Table 14: Genes from some bacterial species, homologous ($I>30\%$) to polysaccharide region of CTnB₁₄. Numbers represent successive open reading frames in the genome. Homologous genes in other species are not found in one region, but rather in smaller groups, in which the genes follow each other with minor gaps.

<i>Prevotella bryantii</i> B ₁₄	<i>Bacteroides dorei</i> DSM 17855	<i>Bacteroides eggerthii</i> DSM 20697	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> DSM 14838
1220	4464	629	788	983	2910	2869
1221	4226	642	163	985	2697	2867
1222	4225	641	164	986	2696	2866
1223	4224	640	181	992	2695	568
1224	4223	638	182	993	2694	569
1225	4214	644	184	996	2688	570

se nadaljuje

nadaljevanje

	<i>Prevotella bryantii</i> B ₁ 4	<i>Bacteroides dorei</i> DSM 17855	<i>Bacteroides eggerthii</i> DSM 20697	<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482	<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> DSM 14838
1226	4212	645	268	997	2685	572	
1227	4172	656	4126	1013	2645	3141	
1228	4171	655	4127	1012	2644	3131	
1229	4169	654	4129	1010	2642	578	
1230	4321	660	4123	1017	2733	2887	
1231	4319	624	4121	1019	2731	2885	
1232	4318	625	4120	1020	2730	2884	
1233	407		4974	4175	152	3333	
1234							
1235	407		2719	4175	152	3333	
1236	1226	2772	3983	1192	541	4558	
1237	3264	2031	3063	2362	1806	1915	
1238	3263	2032	3062		1807	2570	
1239	4465	630	787	981	2911	2870	
1240	4466	646	4113	1031	2912	2875	

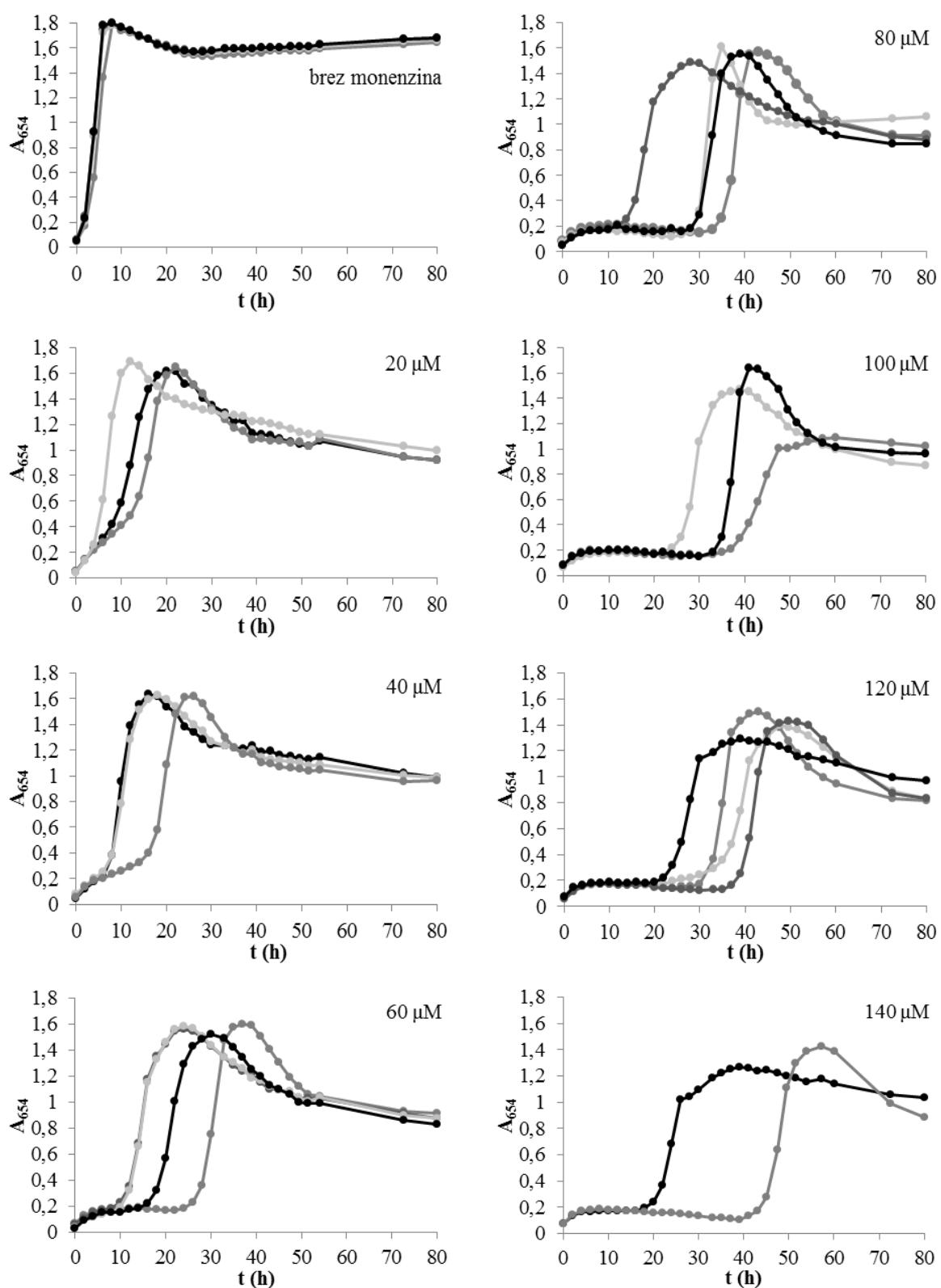
4.2 ODPORNOST PROTI MONENZINU

Kot modelna organizma za preučevanje odpornosti proti monenzinu smo uporabili vampni bakteriji *Prevotella ruminicola* 23 in *Prevotella bryantii* B₁4. Vzgojili smo adaptante na monenzin in z različnimi metodami primerjali njihove lastnosti z lastnostmi divjih tipov.

4.2.1 Preizkus naravne odpornosti in adaptacija divjih sevov na rast ob prisotnosti monenzina

Ker smo v gojišče, v katerem smo gojili preučevane bakterije, dodajali alkoholno raztopino monenzina, smo najprej preverili vpliv alkohola na rast bakterij. Ugotovili smo, da prisotnost 2 % alkohola v gojišču M2 ne vpliva na rast sevov *P. bryantii* B₁4 in *P. ruminicola* 23. To je največja količina alkohola, ki smo jo vnesli v gojišče ob dodatku alkoholne raztopine monenzina.

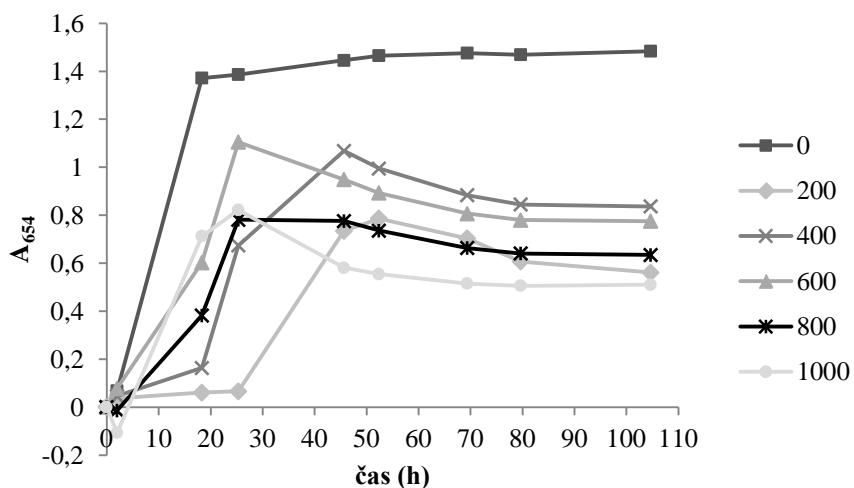
Sev B₁4 je zrasel pri vseh testiranih koncentracijah monenzina (20-140 µM), rasti ni bilo v 5 od 32 epruvet: v eni epruveti pri koncentraciji monenzina 20, 40 in 100 µM ter dveh pri 140 µM (slika 13). Absorbanco pri 654 nm smo merili 80 h, prva paralelka v prisotnosti monenzina (20-D) je največjo absorbanco dosegla po 12 h, zadnja (140-B) pa po 54 h. V gojišču brez monenzina je ta znašala 1,80, medtem ko je bila v prisotnosti monenzina nižja, 1,09-1,69. Hitrost rasti je bila pri vseh koncentracijah monenzina in v gojišču brez njega zelo podobna.



Slika 13: Rast paralelk seva B₁₄ v gojišču s koncentracijo monenzina 0-140 μM.
Figure 13: Growth of strain B₁₄ in M2 medium with monensin concentration 0-140 μM.

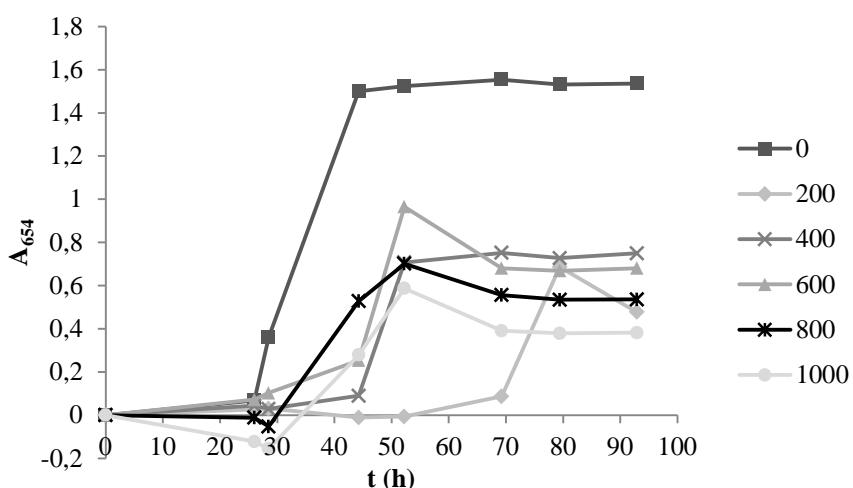
Večjo razliko v hitrosti rasti smo opazili le v začetku rasti seva pri nižjih koncentracijah monenzina (20 in 40 μM), kasneje se je hitrost rasti povečala in bila podobna kot v vseh drugih primerih. Ob rasti seva B₁₄ v gojišču z monenzinom je prisotna faza prilagajanja, ki se z višjo koncentracijo monenzina podaljšuje, čeprav se med paralelkami pri isti koncentraciji monenzina razlikuje.

Ker je sev B₁₄ zrasel tudi pri koncentraciji monenzina 140 μM , smo preverili njegovo rast pri še višjih koncentracijah. Sev B₁₄ je zrasel tudi pri višjih koncentracijah monenzina, vse do koncentracije 1000 μM (slika 14). Ugotovili smo, da je faza prilagajanja najdaljša in istočasno vrednost absorbance najmanjša pri koncentracijah 140-200 μM . Podoben vzorec rasti pri visokih koncentracijah monenzina v gojišču smo pridobili tudi pri sevih *P. bryantii* TC1-1 (slika 15) in TF1-3 (slika 16). Pri vseh treh sevih se faza prilagajanja skrajša, absorbanca pa poveča pri koncentracijah 400-600 mM, pri višjih koncentracijah se absorbanca ponovno zmanjša.



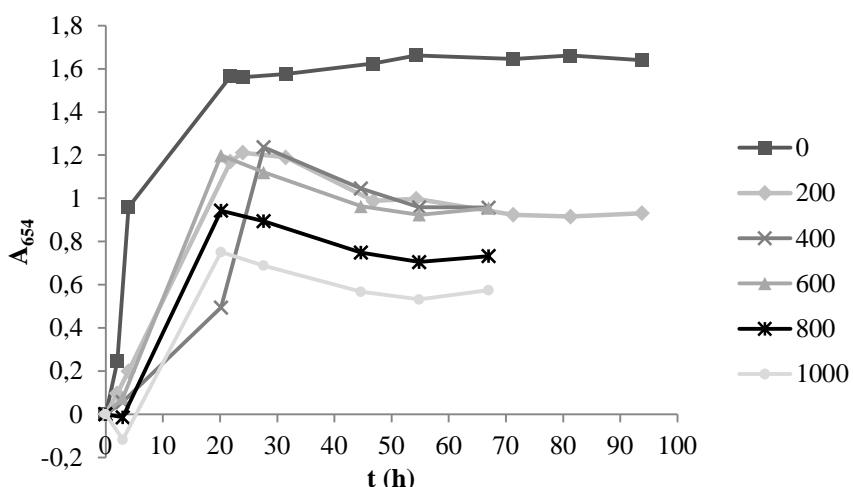
Slika 14: Spremembra povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva B₁₄ v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-1000 μM .

Figure 14: Change of average absorbance observed, when strain B₁₄ grew in M2 medium with monensin concentration 0-1000 μM .



Slika 15: Sprememba povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva *P. bryantii* TC1-1 v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-1000 μM .

Figure 15: Change of average absorbance observed, when strain *P. bryantii* TC1-1 grew in M2 medium with monensin concentration 0-1000 μM .

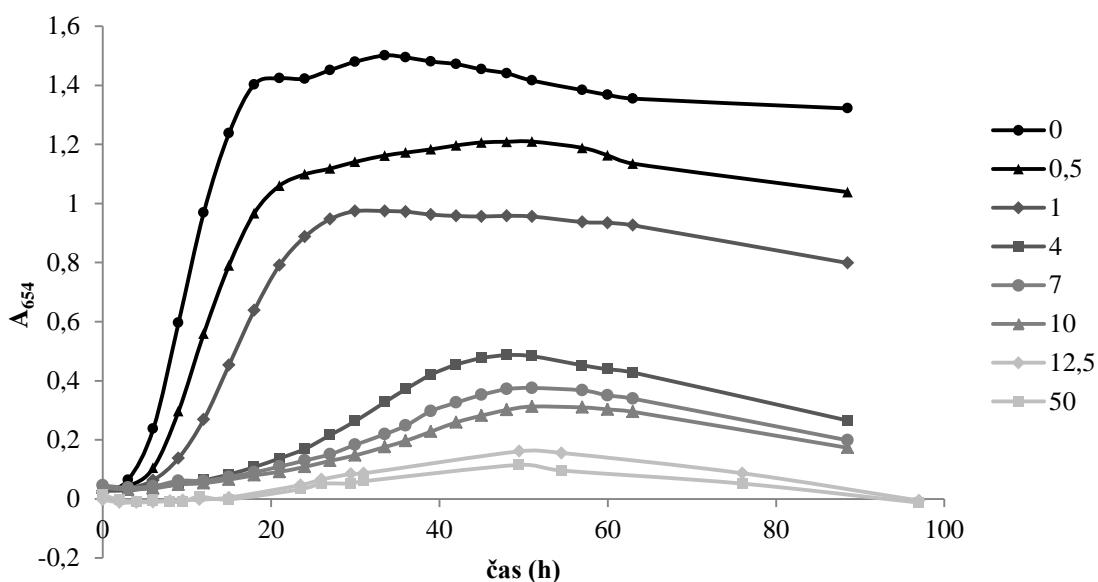


Slika 16: Sprememba povprečne vrednosti absorbance ob rasti seva *P. bryantii* TF1-3 v gojišču s koncentracijo monenzina 0-1000 μM .

Figure 16: Change in average absorbance observed, when strain *P. bryantii* TF1-3 grew in M2 medium with monensin concentration 0-1000 μM .

Sprememba absorbance kultur *P. ruminicola* 23 je bila opazna pri vseh testiranih koncentracijah monenzina, vendar je v gojišču s koncentracijo monenzina 12,5 μM in 50 μM zelo majhna in skoraj zanemarljiva, saj predstavlja le 10,7 % oziroma 7,7 % povprečne vrednosti največje absorbance pri rasti seva v gojišču brez monenzina. V tem poskusu ni zrasla le ena paralelka pri 50 μM , pri koncentracijah monenzina 0,5 M in 4 μM pa je po ena paralelka dosegla nižjo absorbanco kot ostale tri, zato ju nismo vključili v izračun

povprečnih vrednosti absorbance. V nasprotju z rezultati rasti seva B₁₄, so tu opazne velike razlike v hitrosti rasti in največji vrednosti absorbance, ki se zmanjšujeta s povečevanjem koncentracije monenzina v gojišču (slika 17).



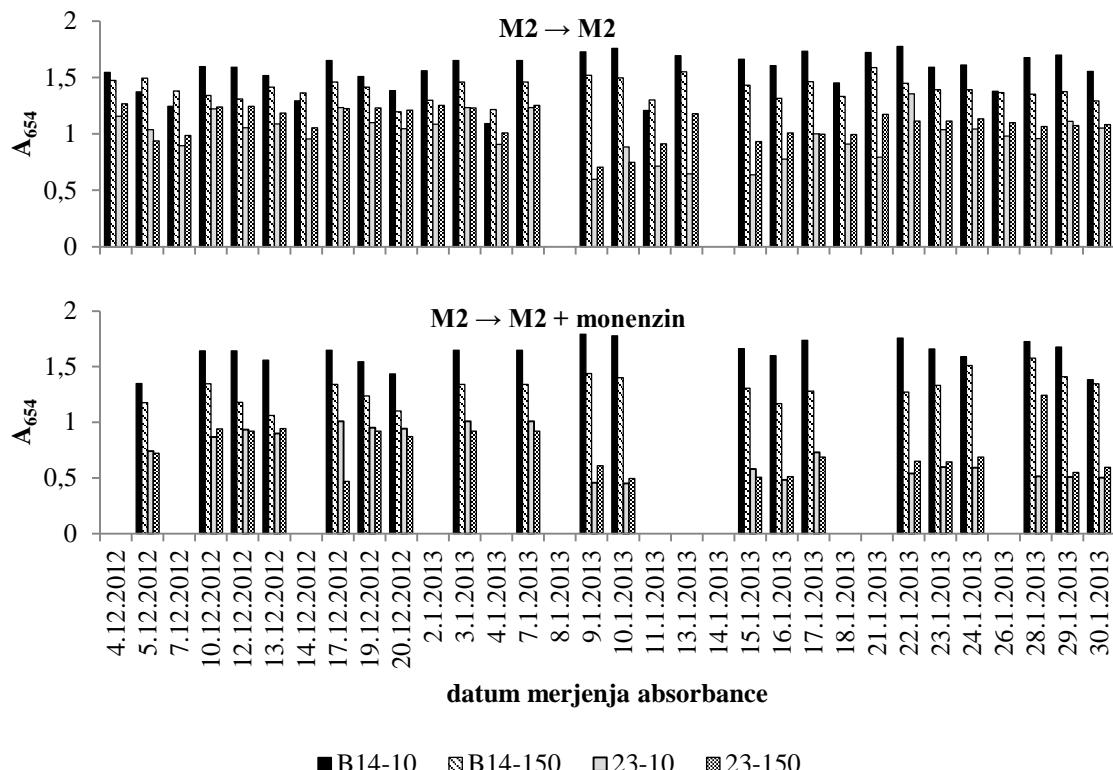
Slika 17: Povprečna vrednost absorbance ob rasti seva 23 v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 0-50 μ M.
Figure 17: Average absorbance, when strain 23 grew in M2 medium with monensin concentration 0-50 μ M.

Ob shranjevanju sevov 23 in B₁₄, ki so rasli v prisotnosti različnih koncentracij monenzina, smo opazili, da so v vbodnikih s poltrdnim gojiščem z vsebnostjo agarja 0,75 % in brez monenzina rasli slabše kot divji tip, njihova rast po odmrzovanju pa ni bila vedno gotova.

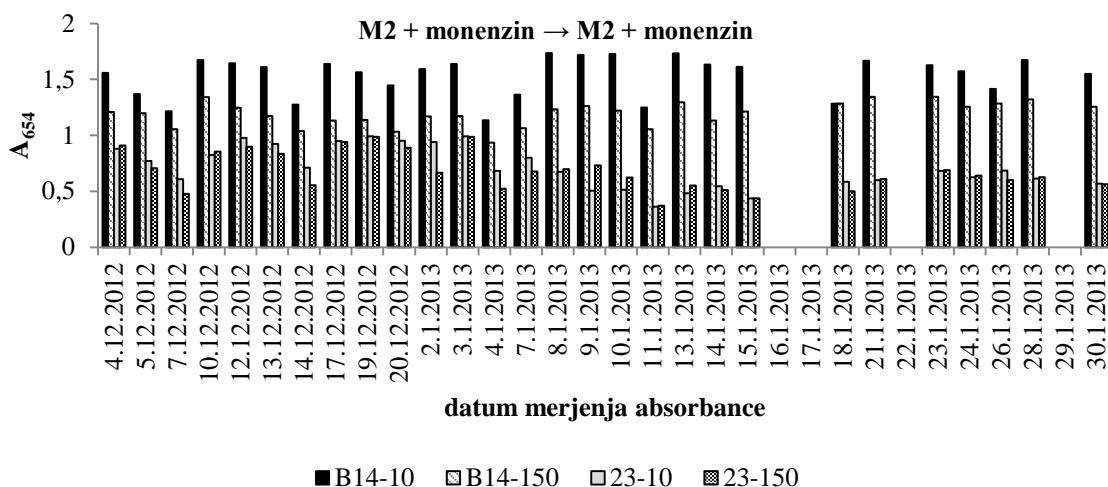
Glede na intenzivnost vpliva koncentracije monenzina na rast seva B₁₄ in izračunano koncentracijo monenzina v vampu goveda kot jo uporabljajo v ZDA (Russell in Houlihan, 2003), smo se odločili, da nadaljnje poskuse izvedemo z adaptantami sevov 23 in B₁₄, ki rastejo pri koncentracijah monenzina 10 μ M in 150 μ M. Adaptante smo poimenovali glede na izvor (sev 23 ali B₁₄) in koncentracijo monenzina, na katero so bile adaptirane (10 ali 150 μ M), npr. 23-10 ali B₁₄-150. Sev B₁₄ smo le precepili v gojišče z ustrezno koncentracijo monenzina, adaptante so v nasprotju z divjim sevom zrasle brez začetnega zamika v rasti. Sev 23 smo adaptirali na rast pri koncentraciji monenzina 150 μ M s postopnim precepljanjem v gojišče z višjo koncentracijo monenzina, tako kot je to opisala Darja Ferme v svoji doktorski disertaciji (Ferme, 2009). Najvišja koncentracija monenzina v gojišču, na katero smo adaptirali sev 23, je bila 1 mM. Po določenem času gojenja adaptant v gojišču z monenzinom ni bilo več faze prilagajanja pri rasti seva B₁₄ pri koncentraciji 150 μ M, največja vrednost absorbance med rastjo seva 23 pri koncentraciji monenzina 10 μ M pa se je precej povečala.

4.2.2 Ohranjanje odpornosti

Adaptante sevov 23 in B₁4 so tudi po 29 precepljanjih v gojišču brez monenzina zrasle v gojišču s koncentracijo monenzina, na katero so bile prvotno adaptirane (slika 18). Adaptanti seva B₁4 sta ob ponovni izpostavljenosti monenzinu še vedno zrastli brez zamika v začetku rasti. Največja izmerjena absorbanca pri spremeljanju rasti adaptant 23-10 in 23-150 po 14 precepljanjih je sicer upadla, vendar je ta pojav opazen tudi pri adaptantah seva 23, ki smo jih istočasno neodvisno gojili izključno v gojišču z dodanim monenzinom (slika 19). Sklepamo, da je vzrok najverjetnejše tehnične narave. Spremembo rasti bi lahko povzročile variacije v vampnem soku, ki je sestavni del gojišča M2, njegova sestava pa je odvisna od krme živali in se razlikuje med posameznimi živalmi. Sestave vampnega soka dolgoročno ne moremo kontrolirati, ker ga pridobivamo v komercialni klavnici in zato nimamo vpliva na izbiro živali.



Slika 18: Največja absorbanca monenzinskih adaptant pri gojenju v gojišču M2 brez monenzina ($M2 \rightarrow M2$) in adaptant, ki smo jih precepili v gojišče M2 s koncentracijo monenzina 10 μM (B₁4-10, 23-10) ali 150 μM (B₁4-150, 23-150) iz kulture prejšnjega dne, ki je zrasla v gojišču brez monenzina ($M2 \rightarrow M2 + monenzin$).
 Figure 18: Maximum optical density of strains adapted to monensin when grown in M2 medium without monensin ($M2 \rightarrow M2$) and optical density of adapted strains, transferred from M2 medium without monensin (from previous day) to M2 medium containing monensin in concentration 10 μM (B₁4-10, 23-10) or 150 μM (B₁4-150, 23-150) ($M2 \rightarrow M2 + monenzin$).

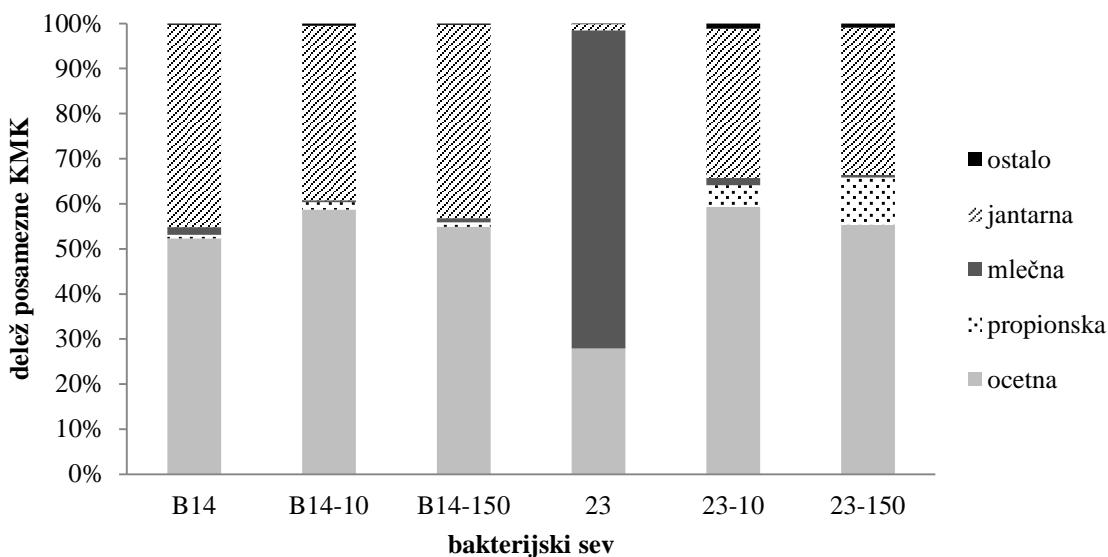


Slika 19: Največja absorbanca monenzinskih adaptant pri gojenju v gojišču M2 s koncentracijo monenzina 10 µM (B₁₄-10, 23-10) ali 150 µM (B₁₄-150, 23-150).

Figure 19: Maximum optical density of strains adapted to monensin when grown in M2 medium containing 10 µM (B₁₄-10, 23-10) or 150 µM (B₁₄-150, 23-150) monensin (M2 → M2 + monenzin).

4.2.3 Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin in plinov

Preverili smo, ali monenzin spremeni razmerje fermentacijskih produktov. Rezultati poskusa so povprečje štirih oziroma pri 23-10 in 23-150 treh meritev, pridobljenih v dveh neodvisnih poskusih (slika 20). Med fermentacijskimi produkti obeh vrst prevotel prevladujejo ocetna in jantarna kislina, ki skupaj predstavlja več kot 88,0 % vseh analiziranih KMK. Izbema je le divji tip bakterije *P. ruminicola* 23, ki je v našem poskusu proizvajal pretežno mlečno (70,6 %), manjši delež ocetne (22,9 %) in le malo jantarne (1,3 %) kisline. Propionska kislina predstavlja znaten delež KMK le pri adaptantah 23-10 (4,9 %) in 23-150 (10,5 %). Pri divjem tipu seva 23 je nismo zaznali, pri vrsti B₁₄ njen delež znaša 0,8-1,6 %. Nasprotno mlečna kislina, ki prevladi med produkti divjega tipa seva 23, v adaptantah iste vrste predstavlja 0,5-1,6 % vseh analiziranih KMK. V profilu KMK divjega tipa in adaptant seva *P. bryantii* B₁₄ ni večjih razlik. Ocetna kislina predstavlja malo več kot polovico količine analiziranih KMK, jantarna nekoliko manj, delež ostalih posameznih KMK ne presega 1,7 %. Pri nobenem divjem tipu ali adaptanti nismo zaznali kapronske in izovalerne kisline. V plinski fazi smo zaznali ogljikov dioksid, ki je predstavljal 94-98,6 % plinske faze, in dušik, ne pa vodika.

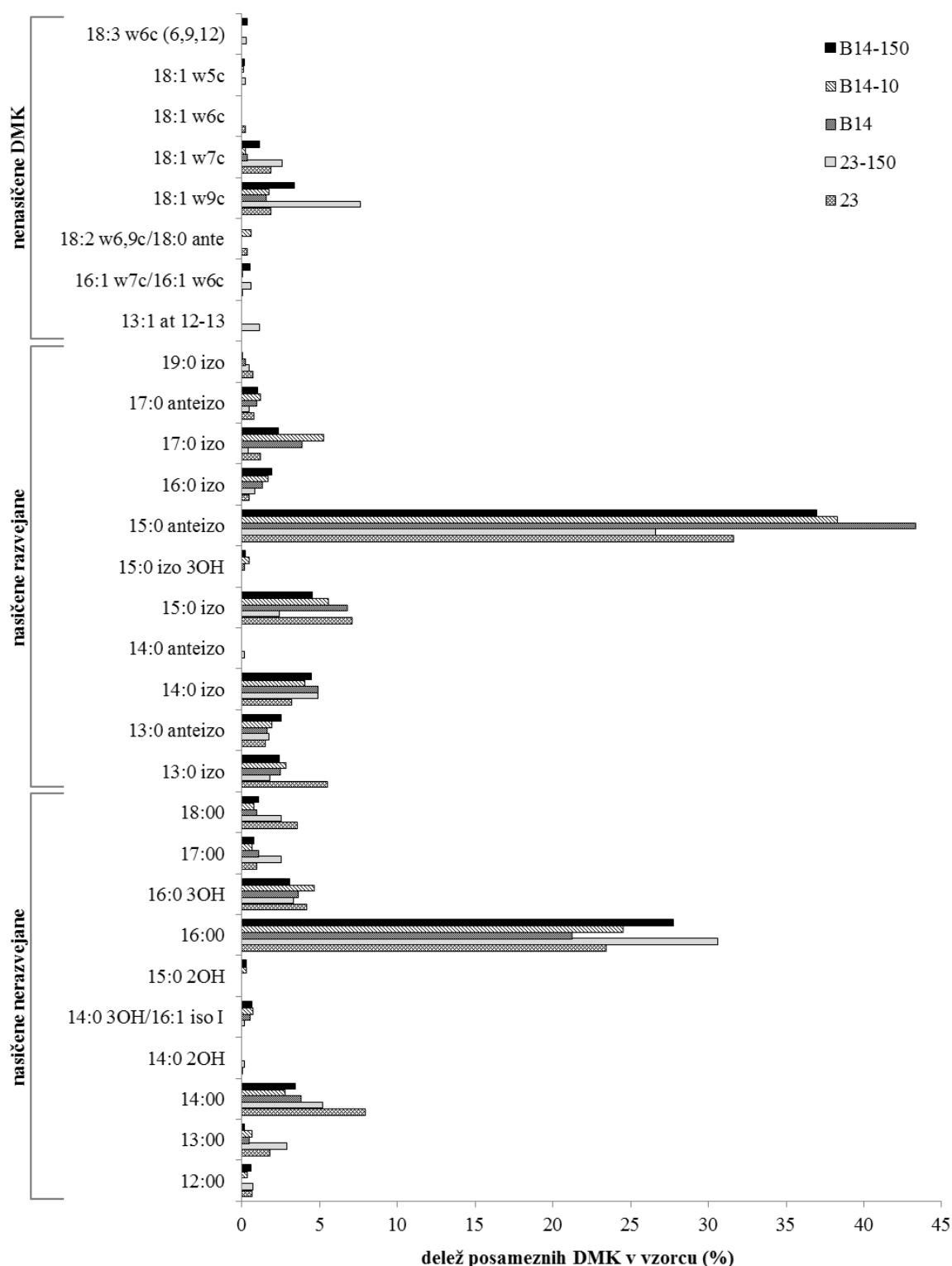


Slika 20: Primerjava povprečnih vrednosti deležev analiziranih KMK v divjih tipih in adaptantah sevov 23 ter B₁₄. Vsota deležev valerne, maslene in izomaslene kisline je prikazana kot ostalo.

Figure 20: Comparison of the profiles of short-chain fatty acids produced by the wild type and adapted strains 23 and B₁₄. Sum of valeric, butyric and isobutyric acid share is presented as »ostalo«. Average values of shares are presented.

4.2.4 Analiza dolgoverižnih membranskih maščobnih kislin

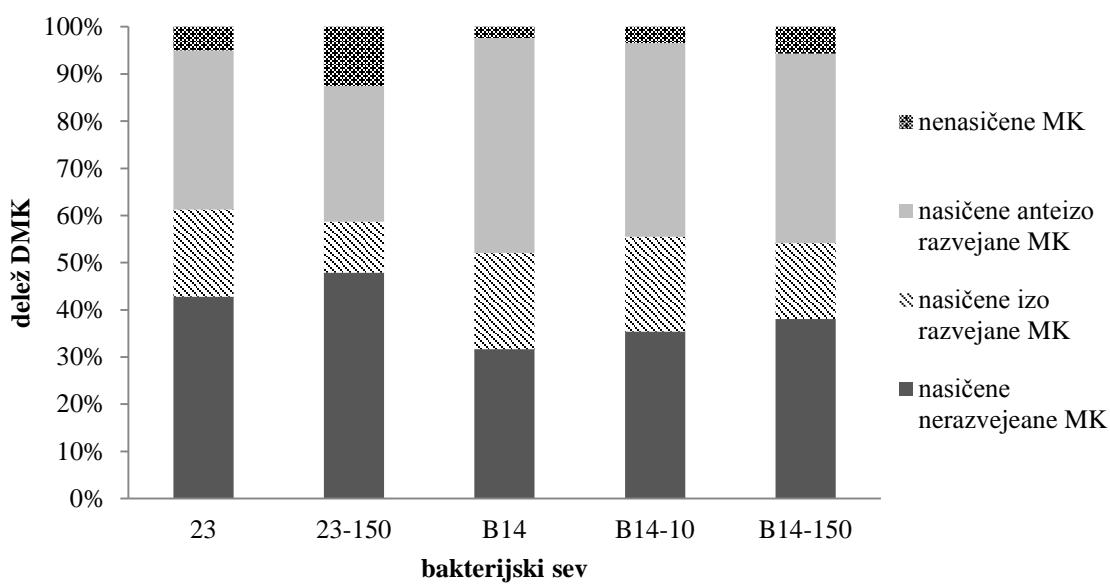
Pri vseh bakterijah v membrani prevladujeta maščobni kislini 15:0 anteizo (26,6-43,3 %) in 16:0 (21,3-30,6 %), ki skupaj predstavlja 55-64,7 % vseh analiziranih DMK pri posameznih sevih (slika 21). Deleži ostalih DMK ne presegajo 8 %. Delež DMK, ki se pojavljajo v adaptantah, ne pa v divjih sevih, in obratno ali tistih, ki se pojavljajo le v eni bakterijski vrsti, je manjši od 0,6 %. Razlike v količini posameznih DMK med divjim tipom in adaptanto so pri sevu 23 večje kot pri sevu B₁₄. Odziv adaptant B₁₄-10 in B₁₄-150 glede na divji tip B₁₄ ni vedno enoten; medtem ko je delež določene DMK pri eni adaptanti večji, je lahko pri drugi manjši glede na delež divjega tipa. Adaptante obeh bakterijskih vrst imajo v membranah večji delež 16:0 in manjši delež 15:0 anteizo.



Slika 21: Primerjava povprečnih deležev posameznih DMK v membranah sevov 23 in B₁4 ter njunih adaptant na monenzin.

Figure 21: Comparison of membrane long-chain fatty acids profiles of wild type and adapted strains 23 and B₁4. Average values of shares are presented.

Ob primerjavi profilov skupin DMK divjih tipov in adaptant obeh vrst (slika 22) smo ugotovili, da so si med seboj zelo podobni, opazne so le manjše spremembe. Trend sprememb je enak pri vseh adaptantah. Delež nasičenih razvejanih MK je za 4,4-12,5 % manjši, nasičenih nerazvejanih MK pa za 3,8-5,9 % večji kot v membranah divjih tipov. Prav tako imajo adaptante v membranah za 0,6-7,3 % več nenasičenih MK.

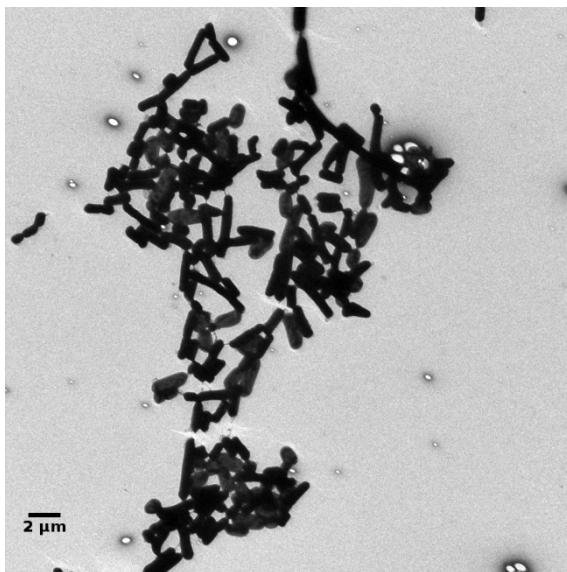


Slika 22: Povprečne vrednosti deležev nenasičenih, nasičenih razvejanih in nasičenih nerazvejanih DMK v membranah divjih tipov in adaptant sevov 23 in B₁₄.

Figure 22: Average values of proportions of unsaturated, straight-chain saturated and branched-chain fatty acids in membranes of wild type and adapted strains 23 and B₁₄.

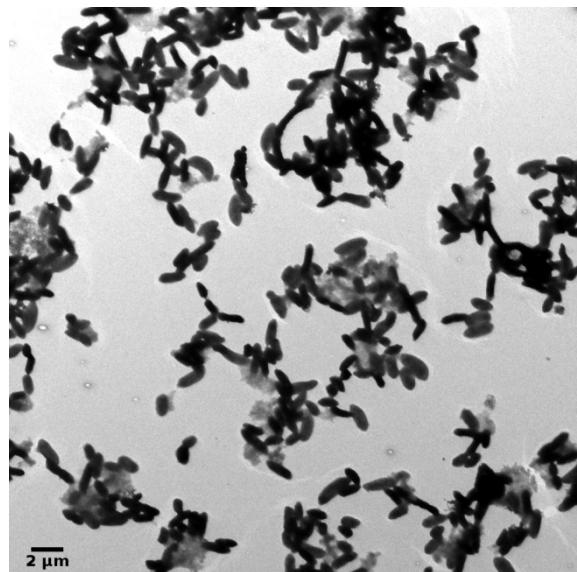
4.2.5 Analiza velikosti celic v prisotnosti in odsotnosti monenzina s presevnim elektronskim mikroskopom

Z elektronskim mikroskopom smo pridobili fotografije divjih tipov in adaptant sevov *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁₄ (sliki 23 in 24). Divja tipa obeh vrst smo gojili v gojišču brez monenzina, adaptanti 23-10 in B₁₄-10 v gojišču s koncentracijo monenzina 10 µM, adaptanti 23-150 in B₁₄-150 pa v gojišču s koncentracijo 150 µM. Morfologija omenjenih vrst se razlikuje, celice seva B₁₄ so v povprečju daljše kot celice seva 23. Med celicami obeh vrst smo opazili svetlejše in bolj zadebeljene celice, ki so bile običajno prisotne v stacionarni fazi rasti. Nismo opazili razlik v spremembah morfologije, ki bi bile skupne obema vrstama bakterij in bi lahko sklepali, da so posledica prisotnosti monenzina. Razlike, ki smo jih opazili in ovrednotili na podlagi t-testa, kot je opisano v poglavju 3.5.5, so opisane v nadaljevanju.



Slika 23: Celice bakterije *P. bryantii* B₁₄ v stacionarni fazи, posnete s presevnim elektronskim mikroskopom.

Figure 23: Cells of *P. bryantii* B₁₄ in stationary phase, obtained with TEM.

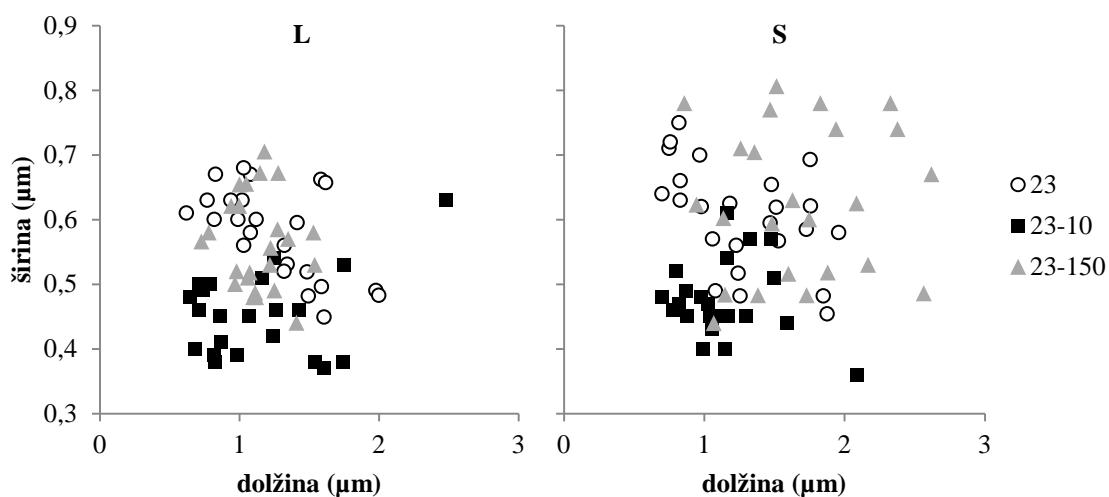


Slika 24: Celice bakterije *P. ruminicola* 23 v stacionarni fazи, posnete s presevnim elektronskim mikroskopom.

Figure 24: Cells of *P. ruminicola* 23 in stationary phase, obtained with TEM.

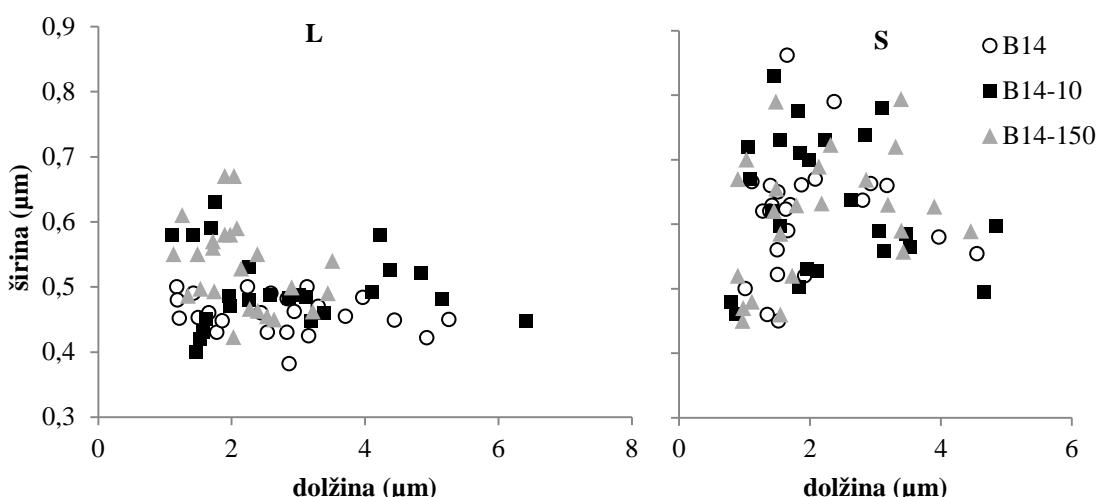
Spremembe morfologije celic seva 23 v odvisnosti od prisotnosti ali odsotnosti monenzina in različnih rastnih faz so prikazane na sliki 25. Celice monenzinske adaptante 23-10 so v logaritemski in stacionarni fazи rasti ožje kot celice divjega tipa in adaptante 23-150, v širini zadnjih dveh ni razlike. Širina in dolžina celic se v rastnih fazah razlikujeta le pri adaptanti 23-150, celice so v stacionarni fazи daljše in širše. Dolžina celic različnih sevov je različna le v stacionarni fazи, v kateri so celice 23-150 daljše kot celice 23-10.

Spremembe morfologije celic seva B₁₄ v odvisnosti od prisotnosti ali odsotnosti monenzina in različnih rastnih faz so prikazane na sliki 26. Tako celice divjega tipa kot obeh adaptantah seva B₁₄ so v stacionarni fazи širše kot v logaritemski, sprememba dolžine celic v stacionarni fazи pa je opazna le pri divjem tipu, celice so *krajše*. V logaritemski fazи so celice adaptant širše od celic divjega tipa, v širini celic obeh adaptant pa ni razlike. Celice B₁₄-150 so v logaritemski fazи *krajše* kot celice divjega tipa in B₁₄-10. V stacionarni fazи ni razlik v širini in dolžini celic treh bakterijskih kultur.



Slika 2523: Primerjava širine in dolžine celic divjega tipa, zraslih v gojišču brez monenzina, in adaptant seva 23, zraslih v gojišču z monenzinom, v logaritemski (L) in stacionarni (S) fazi rasti.

Figure 25: Comparison of length and width of wild type cells grown in the absence of monensin and adapted cells of strain 23 grown in the presence of monensin in logarithmic (L) and stationary (S) phase.



Slika 26: Primerjava širine in dolžine celic divjega tipa, zraslih v gojišču brez monenzina, in adaptant seva B₁₄, zraslih v gojišču z monenzinom, v logaritemski (L) in stacionarni (S) fazi.

Figure 26: Comparison of length and width of wild type cells grown in the absence of monensin and adapted cells of strain B₁₄ grown in the presence of monensin in logarithmic (L) and stationary (S) phase.

4.2.6 Odpornost proti antibiotikom

V preglednici 15 je prikazana primerjava odpornosti divjih in adaptiranih sevov 23 in B₁₄. Obe monenzinski adaptanti seva B₁₄ sta bili bolj odporni kot divji tip proti širim (CH, OX, VA, E; imena so podana v legendi preglednice 15) od 30 testiranih antibiotikov, v petih primerih pa je bila odpornejša le ena adaptanta (B₁₄-10: CPD, CIP, B₁₄-150: TE, CZ, FFC). Obe adaptanti sta bili bolj občutljivi na MET kot divji tip, vendar je bila razlika v

občutljivosti med sevi zelo majhna. Adaptanta B₁4-150 je bila bolj občutljiva na ENO kot divji tip.

Različici seva 23, adaptirani na rast ob prisotnosti monenzina, sta bili manj odporni kot divji tip proti 12 (CM, AZ, TZ, LE, OX, NB, MET, CZ, CXM, FFC, CPD, SXT) od 30 testiranih antibiotikov, v dveh primerih pa je bila manj odporna le ena adaptanta (23-10: F/M, 23-150: C). Proti dvema antibiotikoma (CH, VA) je bila 23-150 bolj odporna kot divji tip.

Preglednica 15: Primerjava odpornosti divjega tipa in adaptant sevov B₁4 in 23 proti antibiotikom iz različnih skupin. V odpornosti sevov ni razlike (0), odpornost sevov se razlikuje (1), prvi sev je bolj odporen (temno siva) ali bolj občutljiv (svetlo siva) od drugega.

Table 15: Comparison of susceptibility of wild type and adapted strains B₁4 and 23 to antibiotics with different mode of action. There is no difference in antibiotic susceptibility of two strains (0), there is difference in antibiotic susceptibility of two strains (1), the first strain is more resistant (dark grey) or more susceptible (light grey) to antibiotic compared to the second one.

Odpornost seva glede na sev			B ₁ 4-10 B ₁ 4	B ₁ 4-150 B ₁ 4	23-10 23	23-150 23
Učinek antibiotikov	Skupina antibiotikov	Oznaka antibiotika				
inhibicija sinteze celične stene	penicilini	OX	1	1	1	1
		P	0	0	0	0
		PG	0	0	0	0
	β-laktami z inhibitorji	AMC	0	0	0	0
	β-laktamaze	SAM	0	0	0	0
	cefalosporini	CEC	0	0	0	0
		CPD	1	0	1	1
		CXM	0	0	1	1
		CZ	0	1	1	1
		TZ	0	0	1	1
	karbapenemi	IMI	0	0	0	0
	glikopeptidi	VA	1	1	0	1
inhibicija sinteze proteinov	fenikoli	C	0	0	0	1
		FFC	0	1	1	1
	linkozamidi	CM	0	0	1	1
	makrolidi	AZ	0	0	1	1
		CH	1	1	0	1
		E	1	1	0	0
	pseudomoniske kisline	MUP	0	0	0	0
	aminoglikozidi	GM	0	0	0	0
		NN	0	0	0	0

se nadaljuje

nadaljevanje			B ₁₄ -10	B ₁₄ -150	23-10	23-150
Odpornost seva	glede na sev		B ₁₄	B ₁₄	23	23
Učinek antibiotikov	Skupina antibiotikov	Oznaka antibiotika				
inhibicija sinteze proteinov	nitrofurani	F/M	0	0	1	0
	tetraciklini	TE	0	1	0	0
inhibicija sinteze proteinov in DNA	nitroimidazoli	MET	1	1	1	1
	diaminopirimidini	SXT	0	0	1	1
inhibicija sinteze DNA	fluorokinoloni	CIP	1	0	0	0
		ENO	0	1	0	0
		LE	0	0	1	1
		NOR	0	0	0	0
	aminokumarini	NB	0	0	1	1

Legenda: azitromicin (AZ), klindamicin (CM), klaritromicin (CH), benzilpenicilin (PG), ceftazidim (TZ), levofloksacin (LE), oksacilin (OX), tetraciklin (TE), vankomicin (VA), imipenem (IMI), eritromicin (E), nitrofurantoin (F/M), metronidazol (MET), kloramfenikol (C), penicilin (P), mupirocin (MUP), amoksicilin/klavulanska kislina (AMC), ampicilin/sulbaktam (SAM), cefazolin (CZ), cefuroksim (CXM), cefaklor (CEC), cefpodoksim (CPD), gentamicin (GM), tobramicin (NN), novobiocin (NB), enrofloksacin (ENO), ciprofloksacin (CIP), norfloksacin (NOR), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT), florfenikol (FFC).

4.2.7 Izolacija DNA in analiza genomskej sekvenč

Da bi ugotovili, ali je bila adaptacija na monenzin pri sevih *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 posledica sprememb – mutacij v genomu, smo se odločili sekvencirati celoten genom adaptant, ki so bile prilagojene na višjo koncentracijo monenzina v gojišču (150 µM) in tudi divjih sevov, ki smo jih pri delu uporabili. Genomsko DNA adaptiranih in divjih sevov smo uspešno izolirali in sekvencirali. Pri poravnavi genomov je na referenčni genom iste vrste iz baze NCBI nalegalo 97,1 % odčitkov B₁₄, 67,1 % odčitkov B₁₄-150, 97,1 % odčitkov 23 in 88,6 % odčitkov 23-150. Delež nukleotidnih mest v referenčnem genomu *P. ruminicola* 23, na katere ni nalegal noben odčitek, je 1,1 %, v referenčnem genomu *P. bryantii* B₁₄ pa 0,02-0,03 %. Povprečna pokritost ostalih mest v referenčnih genomih, na katere se je poravnal vsaj en odčitek, je sledeča: B₁₄ 135×, B₁₄-150 244×, 23 267×, 23-150 154×.

Po bioinformacijski obdelavi in primerjavi genomskej sekvenč divjih tipov in adaptant z ustreznim referenčnim genomom smo odkrili 87-229 razlik (preglednica 16). Po podrobnejem pregledu odkritih razlik, ki so bile prisotne le v posamezni adaptanti, ne pa v divjem sevu, smo odkrili 8 razlik, ki so bile značilne za adaptanto 23-150 (preglednica 17) in 5 razlik, ki so bile značilne le za B₁₄-150 (preglednica 18). Omenjene razlike smo v genomu adaptante 23-150 odkrili v genih, ki kodirajo transkripcijski terminacijski faktor Rho (PRU_0900), podenoto A (okso)kislinske:feredoksin oksidoreduktaze (PRU_1149),

protein iz družine bakterijskih transferaz sladkorjev (PRU_1381), transporter iz družine MFS (PRU_1604), 3-dehidrokinat sintazo (PRU_1681), permeazo transportnega sistema ABC (PRU_1932), transkripcijski regulator iz družine GntR (PRU_1935) in hipotetični protein, ki je potreben za rast v posebnih razmerah (PRU_2548). V genomu adaptante B₁₄-150 pa smo razlike odkrili v genih, ki kodirajo podenoto C ATP sintaze (PBR_0708), 3-oksoacil ATP sintazo (PBR_1589), transkripcijski regulator iz družine AraC (PBR_1710) in glukoza-6-fosfat izomerazo (PBR_1790).

Preglednica 16: Število razlik v genomih B₁₄, B₁₄-150, 23, 23-150 v primerjavi z referenčnima genomoma *P. bryantii* B₁₄ (NZ_ADWO00000000.1) in *P. ruminicola* 23 (NC_014033.1).

Table 16: Number of genetic variants in genomes of B₁₄, B₁₄-150, 23, 23-150 in comparison to reference genomes of *P. bryantii* B₁₄ (NZ_ADWO00000000.1) and *P. ruminicola* 23 (NC_014033.1).

Bakterijski sev	Št. razlik med referenčnim in sekvenciranim genomom
B ₁₄	229
B ₁₄ -150	192
23	87
23-150	92

Gorenc K. Opis mobilnih genetskih elementov in odpornosti proti monenzinu pri bakterijah ... *Prevotella in Bacteroides*.
Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2013

Preglednica 17: Anotacija genetskih sprememb, značilnih za adaptanto 23-150 seva *P. ruminicola* 23.

Table 17: Annotation of genetic variants specific only for the 23-150, adaptant of *P. ruminicola* 23.

Mesto v genomu (bp)	Zapis v referenčnem genomu	Zapis v genomu 23-150	Tip spremembe	% odčitkov z mutacijo	Gen	Produkt gena*	Predviden proces, v katerem sodeluje produkt*	
1053917	T	C	drugačnopomenska mutacija	99	PRU_0900	transkripcijski faktor Rho	razgradnja RNA	
1356724	C	A	drugačnopomenska mutacija	100	PRU_1149	podenota (okso)kislinske:feredoksin oksidoreduktaze	citratni cikel	
1637739	GAA	GA	izbris zamik okvirja	nukleotida, bralnega	99	PRU_1381	protein iz družine bakterijskih transferaz sladkorjev	sinteza polisaharidov
1928925	G	A	drugačnopomenska mutacija	99	PRU_1604	transporter iz družine MFS	morda transport sladkorjev, saj je podoben permeazi lakteze	
2034328	C	T	tiha mutacija	98	PRU_1681	3-dehidrokinat sintaza	sinteza aminokislin	
2321585	G	A	drugačnopomenska mutacija	90	PRU_1932	permeaza ABC transportnega sistema	morda transport makrolidov, saj je podoben MAC ABC transporterju	
2324850	G	A	drugačnopomenska mutacija	98	PRU_1935	transkripcijski regulator iz družine GntR	različni procesi	
3083843	AATTTCTTCTCC	A	izbris in sprememba kodona	72	PRU_2548	hipotetični protein	potreben za rast v posebnih razmerah	

*Kot je razvidno iz baz NCBI in KEGG.

Preglednica 18: Anotacija genetskih sprememb, značilnih za adaptanto B₁₄-150 seva *P. bryantii* B₁₄.

Table 18: Annotation of genetic variants specific only for the B₁₄-150, adaptant of *P. bryantii* B₁₄.

Mesto genomu (soseska, bp)	v Zapis referenčnem genomu	v Zapis genomu B ₁₄ -150	v Tip spremembe	% odčitkov z mutacijo	Gen	Produkt gena*	Predviden proces, v katerem sodeluje produkt*
44, 1101	C	T	drugačnopomenska mutacija	35	PBR_0708	podenota C ATP	energetski metabolizem sintaze
44, 1116	C	T	drugačnopomenska mutacija	66	PBR_0708	podenota C ATP	energetski metabolizem sintaze
100, 3777	C	A	drugačnopomenska mutacija	99	PBR_1589	3-oksoacil ATP	sinteza maščobnih kislin sintaza
102, 14761	G	A	drugačnopomenska mutacija	100	PBR_1710	transkripcijski regulator iz družine AraC	metabolizem ogljikovih hidratov, dušika, odziv na stres, virulenco (Gallegos in sod., 1997; Ibarra in sod., 2008)
105, 35361	G	A	drugačnopomenska mutacija	100	PBR_1790	glukoza-6-fosfat izomeraza	glikoliza

*Kot je razvidno iz baze NCBI.

Hipotetični protein, produkt gena PRU_2548, ima domeni iz proteinskih družin (NCBI, 2013):

- HMM PF03755: Predstavniki te proteinske družine imajo N-terminalno domeno YicC_N. So slabo opisani, prispevajo k preživetju celic v stacionarni fazi.
- HMM PF08340: Funkcija domene DUF1732 ni znana. Pogosto se nahaja na C-terminalni regiji največkrat hipotetičnih bakterijskih proteinov, tudi na proteinih iz družine YicC. Glede na strukturo sklepajo, da domena veže nukleinske kisline.

5 RAZPRAVA

5.1 HIPOTETIČNI KONJUGATIVNI TRANSPOZON CTnB₁4

Veliki konjugativni transpozoni so v bakterijah iz rodu *Bacteroides* zelo razširjeni in pogosto prispevajo k širjenju genov za odpornost proti antibiotikom (Salyers in sod., 1995a). V sorodnih bakterijah iz rodu *Prevotella*, ki naseljujejo podobne ekološke niše in kažejo enake genetske in genomske posebnosti, pa konjugativnega transpozona doslej še niso odkrili oz. opisali. Ker so predhodne raziskave pokazale, da so v bakteriji *P. bryantii* B₁4 geni podobni genom bakterije *B. fragilis* YCH46, ki so del konjugativnega transpozona CTn3-Bf (Gorenc in sod., 2009), smo se odločili raziskati ali *P. bryantii* v resnici vsebuje konjugativni transpozon. Odkritje konjugativnega transpozona bi omogočilo lažje preučevanje in manipulacijo bakterij (Scott, 2002) iz rodu *Prevotella*, tako vampnih kot medicinsko pomembnih vrst, ki zaradi različnih vzrokov (nepoznavanje genetskih zakonitosti, pomanjkanje ustreznih genetskih orodij, različni mehanizmi kot npr. velika nespecifična nukleazna aktivnost) še vedno zaostaja v primerjavi s stanjem raziskav v bolje preučenih bakterijah.

Tipični elementi CTn so geni, ki omogočajo njihov prenos, t.i. geni *tra*. Kljub različnim vrstam CTn v rodu *Bacteroides*, so geni *tra* dober indikator za prisotnost CTn (Salyers in sod., 2004; Schlesinger in sod., 2007). Prvi korak pri raziskovanju obstoja konjugativnega transpozona v *P. bryantii* je zato bil dokaz prisotnosti gena *traG*, najbolj ohranjenega gena v regiji *tra*. Z degeneriranimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih načrtovali na osnovi gena *traG* iz *B. fragilis* YCH46 in njemu podobnih genov, smo s PCR pomnožili sekvenco iz *P. bryantii* B₁4, ki je bila podobna prenašalnim proteinom oz. proteinom TraG več bakteroidet. V nadaljevanju smo želeli ugotoviti, ali so prisotni tudi drugi geni regije *tra* in ugotoviti sekvenco hipotetičnega konjugativnega transpozona v sevu B₁4. V tistem času so na inštitutu JCVI sekvencirali in objavili genomsko sekvenco bakterije *P. bryantii* B₁4, zato smo prešli direktno na analizo sekvence hipotetičnega konjugativnega transpozona CTnB₁4.

Raziskali smo podobnost med že opisanim in delujočim CTnBST iz *B. uniformis* (Gupta in sod., 2003), kriptičnim CTn3-Bf iz *B. fragilis* (Kuwahara in sod., 2004) in CTnB₁4. V genomu seva B₁4 smo odkrili dve regiji z ohranjenim vrstnim redom genov, ki sta zelo podobni regijama na konjugativnih transpozoni CTnBST in CTn3-Bf. Prva je regija *tra*, ki jo sestavljajo geni za prenos konjugativnega transpozona, druga pa ohranjena regija, ki leži proti koncu konjugativnega transpozona, poimenovana regija GG. Zadnja kodira gene za peptidazi iz družine 23, primazo DNA, membranski protein in protein iz družine Fic, ki je prisoten le v CTnB₁4, ne pa v CTnBST in CTn3-Bf, ter hipotetične proteine.

Glede na to, da je v CTnB₁₄ regija GG obrnjena v drugo smer kot pri CTnBST in CTn3-Bf, je pri sevu B₁₄ na tem delu genoma najverjetneje prišlo do inverzije dela DNA. To bi morda lahko pojasnilo tudi veliko večjo razdaljo med ohranjenima regijama v CTnB₁₄ kot pri drugih dveh CTn. Razen v dveh ohranjenih regijah, podobnosti med CTnB₁₄, CTnBST in CTn3-Bf ni. Omenjene ugotovitve in ugotovitev, da se ohranjene regije med CTnB₁₄, CTnBST in CTn3-Bf razlikujejo v prisotnosti oz. odsotnosti določenih genov, so v skladu s teorijo o mozaični strukturi in stalnem spreminjanju bakterijskih genetskih elementov in genomov (Schlesinger in sod., 2007; Osborn in Böltner, 2002; Dutta in Pan, 2002). Hipotetični CTnB₁₄ v regiji *tra* nima 9 homolognih genov, ki se pojavljajo v delujoči regiji *tra* CTnBST, ki ima sicer 27 genov. Ker ne poznamo njihovih funkcij, ne moremo sklepati, ali to vpliva na funkcionalnost regije *tra* CTnB₁₄. Ohranjeni regiji *tra* in GG sta prisotni v različnih vrstah iz rodu *Bacteroides*, kar kaže na razširjenost konjugativnih transpozonov tega tipa v rodu in istočasno na velik pomen obej regij.

DNA, ki je prenesena s horizontalnim genskim prenosom lahko prepoznamo po deležu GC, ki se običajno razlikuje od vrednosti GC v preostalem delu genoma (Schlesinger in sod., 2007). Ohranjeni regiji *tra* in GG imata v vseh analiziranih genomih večji delež GC od povprečne vrednosti GC celotnega CTn, ta pa večji delež GC kot genom, pri čemer je edina izjema B₁₄, pri katerem je delež GC CTn in genoma enak. Različen delež GC v CTn in genomih analiziranih bakterij je v skladu z ugotovitvami Schlesingerja in sodelavcev (2007) o horizontalno prenesenem genskem materialu. Enak delež GC CTnB₁₄ in genoma seva B₁₄ bi lahko pomenil, da je v CTnB₁₄ prišlo do več sprememb oziroma prilagoditve DNA značilnih za vrsto bakterije v večjem obsegu kot v drugih analiziranih genomih, kar bi bilo bolj verjetno, če CTn ne bi bil funkcionalen. Po drugi strani pa ohranjanje velike vsebnosti GC ohranjenih regij kaže na njuno pomembno vlogo.

CTnB₁₄ ima gene z raznolikimi funkcijami, ne posreduje pa odpornosti proti antibiotikom. Največji delež produktov, ki jih kodirajo geni CTn, sodeluje pri metabolizmu ogljikovih hidratov. Večina teh genov je strnjena v eni regiji, ki ni prisotna v CTnBST ali CTn3-Bf, njena organizacija pa spominja na PUL (Martens in sod., 2008), opisane v bakterijah iz rodu *Bacteroides*. Značilnosti PUL, ki smo jih opazili v regiji za razgradnjo sladkorjev in polisaharidov v *P. bryantii* so prisotnost (i) genov za membranska proteina SusC in SusD, ki sodelujeta pri vezavi in transportu oligosaharidov v periplazemski prostor, (ii) gena za komponento hibridnega dvokomponentnega sistema in (iii) več genov vpletenih v metabolizem ogljikovih hidratov (Xu in sod., 2007). Regija z geni za metabolizem ogljikovih hidratov bi se lahko v *P. bryantii* prenesla s horizontalnim prenosom iz bakterij iz rodu *Bacteroides*, vendar v času raziskave v nobenem genomu nismo našli regije, ki bi imela ohranjen vrstni red genov celotne regije, ki je prisotna v B₁₄. Običajno so bile v drugih genomih, večinoma iz vrst *Bacteroides*, prisotne le manjše skupine homolognih genov, ki so si zaporedno sledili. Na podlagi dosedanjih ugotovitev ne moremo sklepati, ali se je omenjena regija vnesla v sev B₁₄ s CTnB₁₄, se vključila v CTn kasneje ali prenesla

na sedanje mesto z inverzijo genomskega odseka, glede na to, da leži v bližini regije GG, ki ima glede na ostale CTn v CTnB₁4 obrnjeno orientacijo.

CTnB₁4 se je najverjetneje prenesel v *P. bryantii* B₁4 iz vrste iz rodu *Bacteroides* in ne obratno. Po prenosu v sev B₁4 je v CTnB₁4 očitno prišlo do več sprememb, ki kažejo na to, da CTn verjetno ni več funkcionalen. Prihodnje raziskave na tem področju bi bilo zato smiselno usmeriti v poskus prenosa hipotetičnega CTnB₁4 in morda še katerega drugega hipotetičnega CTn iz vrst *Bacteroides*, pri katerih smo pokazali prisotnost ohranjenih regij *tra* in GG, ki ima bolj ohranjeno regijo *tra* kot CTnB₁4, regijo GG orientirano kot v delujočem CTnBST in krajšo dolžino CTn.

5.2 ODPORNOST BAKTERIJ *P. bryantii* in *P. ruminicola* PROTI MONENZINU

Pri optimizaciji reje živali je zaželen čim večji izkoristek krme, ki jo žival zaužije. V govedoreji pomembno vlogo pri tem igrajo mikroorganizmi, saj so nepogrešljivi pri razgradnji krme v vampu, predvsem rastlinskih polisaharidov. Tako lahko manipulacijo vampnega metabolizma izvajamo s spreminjanjem krme (Fahey in sod. 1993), krmnega režima (Nagaraja in sod., 1997) ali vplivom na vampne mikroorganizme. Na mikrobnouzdružbo lahko vplivamo z genskim spreminjanjem ali uporabo krmnih dodatkov. Kot krmni dodatki, ki večajo izkoristek hranil in pospešujejo rast živali, se pogosto uporablja antibiotiki (Russell in Houlihan, 2003). V Evropi je uporaba antibiotikov kot krmnih dodatkov od leta 2006 prepovedana (Uredba Evropskega parlamenta in Sveta..., 2003) zaradi strahu pred širjenjem odpornosti proti antibiotikom, redno pa se uporablja v ZDA, Avstraliji, Novi Zelandiji in Latinski Ameriki (Aarestrup, 2000). Prepoved uporabe antibiotikov kot krmnih dodatkov je zajela tudi ionoforne antibiotike, ki so se uporabljali v govedoreji, čeprav so še vedno dovoljeni kot kokcidiostatiki pri reji perutnine.

Mehanizem odpornosti proti ionofornim antibiotikom ni dobro poznan, že samo delovanje ionofornih antibiotikov pa je drugačno od delovanja medicinsko pomembnih antibiotikov, ki vplivajo na celično membrano. Ionofori v membrani delujejo kot antiporterji, ki izmenjujejo katione in protone ter s tem porušijo gradiente natrijevih ter kalijevih kationov med notranjostjo in zunanjostjo celice. Glede na to, da (i) za zdravljenje okužb v humani medicini in veterini ionofornih antibiotikov ne uporabljam, ker jih zaradi nespecifičnosti delovanja prenašajo le redke vrste živali, (ii) do sedaj ni dokazov o genetskih elementih, ki bi omogočali prenos odpornosti proti ionoforom ali o prenosu odpornosti med bakterijami in (iii) so v živalih, ki nikoli niso prejemale inoforov, prisotne odporne bakterije (Russell in Houlihan, 2003), smo se odločili raziskati upravičenost prepovedi teh snovi v živinoreji, ki velja od leta 2006 dalje, čeprav so nekatere študije jasno pokazale povečanje stroškov reje ob prenehanju uporabe teh snovi. Najprej smo želeli ugotoviti, kakšen je mehanizem odpornosti proti ionofornim antibiotikom. Zanimalo nas je predvsem, ali obstaja genetska podlaga, ki bi podala možnosti za horizontalni prenos genov, ki kodirajo odpornost proti

antibiotikom. Kot model smo uporabili vampni bakteriji *Prevotella bryantii* B₁₄ in *Prevotella ruminicola* 23, ki sta sposobni adaptacije na ionoformi antibiotik monenzin. Pripravili smo adaptante sevov B₁₄ in 23, odpornih proti nižji (10 µM) in višji (150 µM) koncentraciji monenzina ter primerjali njihove lastnosti z lastnostmi divjih sevov.

5.2.1 Odpornost divjih tipov proti monenzinu in adaptacija na monenzin

Sevi bakterijskih vrst iz rodu *Prevotella* se razlikujejo v odpornosti proti monenzinu. Callaway in Russell (2000) sta preverila odpornost različnih sevov prevotel proti monenzinu. Uporabila sta desetkratne redčitve monenzina, tako da je bila koncentracija monenzina v gojišču 0,001-10 µM. *P. bryantii* B₁₄ se je v omenjeni raziskavi izkazal za najbolj odporen sev, ki se lahko najbolje prilagodi na prisotnost monenzina in postane odporen proti visokim koncentracijam monenzina (Callaway in Russell, 2000). Zrasel je pri najvišji testirani koncentraciji monenzina 10 µM, *P. brevis* GA33, *P. albensis* M384 in dva seva iz vrste *P. ruminicola* pri 1 µM, drugi sevi vrste *P. ruminicola* pa le pri nižjih koncentracijah monenzina (0,001-0,1 µM). Bakterija *P. bryantii* B₁₄ se lahko adaptira tudi na ionoformi antibiotik lasalocid, čeprav je nanj bolj občutljiva kot na monenzin (Callaway in Russell, 1999).

Sev B₁₄ je v naši raziskavi zrasel pri vseh testiranih koncentracijah monenzina, za katere smo se odločili na podlagi predhodne študije (Ferme, 2008), ki je ugotovljala minimalne inhibitorne koncentracije krmnih dodatkov za vampne bakterije, med njimi tudi minimalno inhibitorno koncentracijo monenzina za bakteriji *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁₄, ki smo ju uporabili v naši raziskavi. Čeprav Ferme (2008) ugotavlja, da je minimalna inhibitorna koncentracija monenzina za sev B₁₄ 100 µM, je v našem poskusu omenjeni sev zrasel pri 140 µM, ki je bila najvišja koncentracija v poskusu ugotavljanja odpornosti seva B₁₄ proti monenzinu. Razlike v rezultatih so morda odraz gojenja v različnih eksperimentalnih sistemih, saj so bakterije gojili v mikrotitrskih ploščah, v naši raziskavi pa smo uporabili Hungatove epruvete. V našem eksperimentu smo pri koncentracijah monenzina 20 in 40 µM opazili upočasnjeno naraščanje začetnih vrednosti absorbance glede na rast v gojišču brez monenzina, pri višjih koncentracijah monenzina pa zamik v začetku rasti. Po fazi prilagajanja je sev B₁₄ pri vseh testiranih koncentracijah monenzina rasel s podobno hitrostjo kot v gojišču brez monenzina. Callaway in Russell (1999) sta poročala, da je bila začetna hitrost rasti pri koncentraciji monenzina 10 µM za 50 % manjša kot v gojišču brez monenzina, učinek monenzina na začetno hitrost rasti pa opazen že pri koncentraciji 1 µM. Pri rasti v gojišču s koncentracijami monenzina do 140 µM se največja izmerjena absorbanca razlikuje, meri pa 60,6-93,9 % najvišje vrednosti absorbance seva v gojišču brez monenzina. Ker je sev B₁₄ zrasel pri vseh koncentracijah monenzina, ki smo jih testirali, v literaturi pa je najvišja koncentracija, pri kateri so preverili rast divjega seva B₁₄ 10 µM, nas je zanimalo pri kateri koncentraciji monenzina sev še raste. Ugotovili smo, da sev B₁₄ raste tudi pri koncentraciji monenzina 1 mM.

Preverili smo tudi odpornost dveh drugih sevov vrste *P. bryantii*, TC1-1 in TF1-3. Izkazalo se je, da sta prav tako odporni proti visokim koncentracijam monenzina in rasteta še tudi pri koncentraciji monenzina 1 mM.

V literaturi poročajo, da je divji sev *P. ruminicola* 23 sposoben rasti v gojišču s koncentracijo monenzina manjšo od 0,9 µM (Dawson in Boling, 1984; Morehead in Dawson, 1992; Callaway in Russell, 2000), naši rezultati pa so pokazali, da sev 23 raste tudi pri višji koncentraciji monenzina. Pri koncentraciji monenzina 1 µM smo izmerili največjo vrednost absorbance, ki je predstavljala 63,8 % največje vrednosti absorbance v gojišču brez monenzina, pri 4 µM je ta vrednost predstavljala 32,4 %, pri 7 µM 25,0 %, pri 10 µM pa 20,8 %. Naši rezultati so približno v skladu z ugotovitvijo študije (Ferme, 2008), ki je ugotovila, da je minimalna inhibitorna koncentracija monenzina za sev 23 12,5 µM. Ugotovili smo, da se z večjo količino monenzina v gojišču zmanjšuje največja izmerjena vrednost absorbance in hitrost rasti seva 23. Dawson in Boling (1984) sta poleg počasnejše rasti opazila tudi zamik začetka rasti tako pri *P. ruminicola* 23 kot *P. brevis* GA33 v primerjavi s sevom, ki je rasel v gojišču brez monenzina. Način rasti bakterij *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁₄ se v prisotnosti monenzina razlikuje, *P. ruminicola* 23 je nanj bolj občutljiva. Upočasnjeno hitrost rasti, ki smo jo v prisotnosti monenzina opazili pri sevu *P. ruminicola* 23, smo pri *P. bryantii* B₁₄ opazili le v začetku rasti v prisotnosti koncentracij monenzina 20 in 40 µM. Prav tako je sprememba v največji izmerjeni absorbanci pri rasti seva 23 v prisotnosti ali odsotnosti monenzina veliko bolj intenzivna kot pri sevu B₁₄.

Rast divjih tipov v prisotnosti monenzina je običajno počasnejša kot rast v gojišču brez monenzina, vendar postane po nekaj precepljanjih v gojišču z monenzinom primerljiva z rastjo divjega tipa v kontrolnem gojišču, kar smo opazili tudi v našem poskusu. Skoraj vsem testiranim sevom prevotel je skupno, da se ob predhodni izpostavljenosti monenzinu nanj prilagodijo in so nato sposobni rasti pri višjih koncentracijah monenzina, pri katerih divji tipi ne zrastejo. Spremembe v hitrosti rasti so povezane s koncentracijo kalijevih ionov v celicah. Koncentracija teh ob prvi izpostavitvi ionofornim antibiotikom upade, nato pa se po nekaj precepljanjih v gojišče z ionofornim antibiotikom postopoma zviša (Morehead in Dawson, 1992; Callaway in Russell, 2000; Dawson in Boling, 1984; Callaway in Russell, 1999; Chen in Wolin, 1979).

Najvišje koncentracije, pri katerih so po poročilih raziskovalcev rasli posamezni adaptirani sevi so 50-58 µM za *P. brevis* GA33 in *P. ruminicola* 23 (Ferme, 2008; Morehead in Dawson, 1992), 20 µM za *P. bryantii* B₁₄ in 1 µM ali manj za različne seve iz vrste *P. ruminicola* (Callaway in Russell, 2000). Rezultati raziskav se razlikujejo, saj so odvisni od količine inokuluma, pH in koncentracije ionov v gojišču (Chow in Russell, 1990; Callaway in Russell, 2000; Dawson in Boling, 1984). V našem poskusu smo sev *P. ruminicola* 23 adaptirali na koncentracijo monenzina 150 µM. Znano je, da se na monenzin lahko adaptirajo tudi druge po Gramu negativne in pozitivne bakterije, kot so *Fibrobacter*

succinogenes S85 (Chen in Wolin, 1979), *Clostridium aminophilum* F (Rychlik in Russell, 2002), *Selenomonas ruminantium* in *Streptococcus bovis* (Callaway et al., 1999). Omenjene bakterije so bile večinoma manj odporne proti monenzinu kot *P. ruminicola*, vendar se izsledki raziskav razlikujejo, zato je iz teh podatkov težko izluščiti enoten sklep.

5.2.2 Ohranitev odpornosti proti monenzinu

Pokazali smo, da se odpornost adaptant sevov 23 in B₁₄ proti monenzinu ohranja, saj so rasle v prisotnosti monenzina tudi po 29 prenosih v gojišču brez antibiotika. Da se odpornost sevov proti monenzinu ohrani, so pri bakterijah *P. ruminicola* 23 in *P. brevis* GA33 predhodno pokazali tudi Ferme (2008) in Morehead in Dawson (1992). Nasprotno pa so v nekaterih raziskavah avtorji ugotovili, da se odpornost proti monenzinu v čistih kulturah bakterij *P. bryantii* B₁₄ (Callaway in Russell, 1999), *C. aminophilum* F (Rychlik in Russell, 2002; Houlihan in Russell, 2003), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium perfringens* (Simjee in sod., 2012) ali v združbi vampa (Lana in Russell, 1996) po ukinitvi dodajanja antibiotika v kulturo ali krmo živali relativno hitro izgubi.

5.2.3 Profil produktov fermentacije

Glavna produkta fermentacije vrste *P. bryantii* v gojiščih z glukozo sta ocetna in jantarna kislina, v manjši meri ali le sledovih tudi mravljinčna, propionska, izomaslena in izovalerna kislina. Pri fermentaciji vrste *P. ruminicola* nastajajo enaki produkti, le da je delež mravljinčne kisline večji (Krieg in sod., 2010). Sev *P. bryantii* B₁₄, ki smo ga gojili v gojišču brez monenzina, je po pričakovanjih proizvajal največ ocetne in jantarne kisline. Med produkti smo zaznali še mlečno, propionsko in masleno kislino, vendar deleži posameznih KMK niso presegali 1,7 %. Divji tip *P. ruminicola* 23 je proizvajal ocetno kislino, vendar je večinski delež, kar 70 %, predstavlja mlečna kislina. Delež jantarne kisline je znašal le dober odstotek, poleg nje pa smo v zelo majhni količini zaznali še masleno kislino. Mravljinčne kisline, ki se sicer v literaturi v manjši meri pojavlja med fermentacijskimi produkti obeh vrst, z našo metodologijo nismo zaznavali.

Razloga za tako veliko produkcijo mlečne kisline divjega tipa 23 v našem poskusu ne poznamo. Morda je kdaj v laboratorijski zgodovini seva prišlo do mutacij, ki bi lahko vplivale na potek fermentacije. V nadaljevanju raziskave bi bilo zato smiselno preučiti genetske razlike med sevom bakterije *P. ruminicola* 23, ki so jo izolirali v ZDA pred več kot 50 leti (Bryant in sod., 1958) in kulturo istega seva, ki je bila v 1980-ih letih prenesena na Rowett Research Institute (Aberdeen, Škotska) in od tam pred 25 leti v naš laboratorij. Poleg tega bi bilo smiselno ponovno analizirati profil fermentacijskih produktov obeh omenjenih kultur. Večji delež mlečne namesto jantarne kisline bi lahko zaradi posledično nižje vrednosti pH kulture pojasnil tudi spremembo v obsegu rasti seva *P. ruminicola* 23,

ki sedaj zraste do manjših maksimalnih koncentracij (sodeč po podatkih pridobljenih z direktnim štetjem s pretočnim citometrom in merjenjem optične gostote kulture) kot pred leti na Škotskem (Avguštin, 2013).

Ugotovili smo, da se razmerje KMK seva B₁₄ v prisotnosti monenzina ne spremeni bistveno. Adaptirana seva bakterije *P. ruminicola* 23 sta v prisotnosti monenzina proizvajala veliko več ocetne in jantarne kislino kot divji tip v gojišču brez monenzina, saj sta skupaj predstavljeni več kot 88 % analiziranih KMK. Mlečna kislina, ki je glavni produkt fermentacije divjega tipa, predstavlja pri adaptantah le manjšino, prisoten pa je znaten delež propionske kislino, ki je pri divjem tipu nismo zaznali. Znano je, da monenzin spremeni razmerje ocetne in propionske kislino v mikrobeni združbi vampa v prid propionske kislino. Ta sprememba je zaželjena, saj posledično nastane manj metana in so energetske izgube metabolizma manjše. Spremembo razmerja ocetne in propionske kislino proti propionski kislini so v manjši meri opazili tudi pri bakterijah *Escherichia coli* in *Salmonella* spp., na rast katerih monenzin sicer nima vpliva (Edrington in sod., 2003). Morehead in Dawson (1992) sta prav tako pokazala, da prisotnost monenzina spremeni profile KMK tako divjega tipa kot nanj adaptirane različice *P. ruminicola* 23. Odporen sev v prisotnosti monenzina je proizvajal več jantarne kislino, malo več ocetne in propionske ter malo manj izomaslene, maslene, izovalerne in valerne kislino kot divji tip v gojišču brez monenzina. Mlečne kislino v omenjeni raziskavi niso merili.

5.2.4 Sestava membranskih DMK

Bakterije iz rodu *Prevotella* imajo tipično velik delež razvejanih DMK (Marinšek Logar in sod., 2001; Miyagawa, 1982, Kaneda, 1991). Glavni DMK vrst *P. bryantii* in *P. ruminicola* sta 15:0 anteizo in 15:0 (Krieg in sod., 2010).

V rezultatih našega poskusa sta pri sevu *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B₁₄ prevladovali DMK 15:0 anteizo in 16:0, ki sta skupaj predstavljeni več kot polovico vseh DMK. Da je DMK 15:0 anteizo glavna MK v profilu vrste *P. ruminicola* oziroma seva 23, poročajo tudi Shah in Collins (1983) ter Miyagawa (1982). Razmerja ostalih DMK bakterije *P. ruminicola* 23, ki smo jih pridobili, so v skladu z rezultati zadnje raziskave (Miyagawa, 1982). V raziskavi Marinšek Logar in sodelavcev (2001) so bile najbolj zastopane DMK v bakterijah iz rodu *Prevotella* 15:0 anteizo, 15:0, 15:0 izo in 16:0. Prisotne so bile tudi za vrsto značilne MK, ki jih v našem poskusu nismo zaznali, vendar je potrebno upoštevati, da so se razmere pri poskusih razlikovale, profil maščobnih kislin bakterij z razvejanimi MK pa je odvisen od rastnih razmer kot so faza rasti, temperatura, pH, razpoložljivost kisika, vir ogljika in razpoložljivost prekurzorjev (izolevcin, levulin, valin) (Kaneda, 1991). Marinšek Logar in sodelavci so mikroorganizme gojili v gojišču brez vampnega soka in jih poželi po enem dnevu rasti, medtem ko smo v naši raziskavi uporabili gojišče z dodanim

vampnim sokom in jih poželi v časovnih točkah, ki so ustrezale sredini logaritemsko faze rasti posameznih sevov glede na spremeljanje absorbance.

Profili DMK divjih tipov in adaptant v naši raziskavi so bili podobni. Vsebovali so iste DMK, a v različnih deležih. Adaptante obeh bakterijskih vrst so imele v membrani večji delež 16:00 in manjši delež 15:0 anteizo, največja razlika v deležu posamezne DMK med adaptiranim in divjim tipom je bila 7,2 %. V splošnem je delež nasičenih DMK v adaptantah manjši, nenasičenih DMK pa večji glede na delež DMK v divjem tipu. V skupini nasičenih maščobnih kislin je v adaptantah glede na divji tip delež razvezanih MK manjši, nerazvezanih MK pa večji.

Sprememba maščobne sestave membrane bi lahko vplivala na vezavo antibiotika na mikrobeno celico ali otežila vgraditev ionoforom v membrano oziroma upočasnila njihovo prehajanje z ene strani membrane na drugo in s tem prenos kationov. Eksperimenti z bakterijo *Acholeplasma laidlawii* so pokazali, da večji delež nenasičenih MK v membrani omogoča učinkovitejše delovanje narazina, enega izmed ionofornih antibiotikov (Smith and Stout, 1980). Avtorji sklepajo, da večja fluidnost membrane zaradi večjega deleža nenasičenih MK omogoča lažje prehajanje narazina skozi membrano in s tem njegovega delovanja kot antiporter. Glede na to hipotezo bi pričakovali, da bi imele adaptirane celice v membrani več nasičenih MK kot divji tip, naši rezultati pa kažejo ravno obratno.

5.2.5 Velikost celic

Celice vrste *P. bryantii* so običajno kokoidne do ovalne oblike, velike $0,8\text{-}1,0 \times 1,0\text{-}5,0 \mu\text{m}$, celice vrste *P. ruminicola* pa $0,8\text{-}1,0 \times 0,8\text{-}30 \mu\text{m}$ z ošiljenimi, vendar zaobljenimi konci. Večina celic *P. ruminicola* je dolga $1,2\text{-}6 \mu\text{m}$ in so pogosto enkapsulirane. Pojavljajo se samostojno ali v paru, včasih tvorijo verižice, v katerih so celice dolge ali kokoidne oblike (Krieg in sod., 2010). Celice divjega tipa B₁₄, ki smo jih izmerili, so bile v logaritemski fazi povprečno velike $0,46 \times 2,7 \mu\text{m}$, v stacionarni fazi pa $0,62 \times 2,0$. Tudi celice divjega tipa 23 so bile ožje kot je opisano v literaturi (Krieg in sod., 2010). V različnih rastnih fazah ni bilo bistvene razlike v velikosti celic divjega tipa 23. V logaritemski fazi so celice povprečno merile $0,58 \times 1,3 \mu\text{m}$, v stacionarni pa $0,61 \times 1,3 \mu\text{m}$.

Iz meritev širine in dolžine adaptiranih celic in divjih tipov *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 ne moremo sklepati o vplivu monenzina na morfologijo celic. Rezultati ne kažejo vpliva monenzina, ki bi bil skupen celicam istega seva, adaptiranim na različni koncentraciji monenzina ali adaptiranim celicam obeh sevov, adaptiranih na isto koncentracijo monenzina. Nasprotno so Ferme in sodelavci (2008) ugotovili, da monenzin vpliva na morfologijo celic *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23. V gojišču brez monenzina je bila površina celic seva B₁₄ v stacionarni fazi rasti manjša kot v logaritemski fazi,

medtem ko je bilo v prisotnosti monenzina ravno obratno. Površina celic seva B₁₄, gojenih v prisotnosti monenzina je bila v stacionarni fazi večja od celic gojenih brez monenzina, medtem ko v logaritemski fazi niso ugotovili signifikantnih razlik. Pri sevu 23 je bil vzorec podoben, čeprav manj izrazit. Razlik med površino celic v logaritemski in stacionarni fazi niso opazili le pri sevu *P. ruminicola* 23, ki je rastel v prisotnosti nizke koncentracije monenzina (0,391 µM). Na podlagi podobnih učinkov cinamaldehida in monenzina na celice sevov B₁₄ in 23 so predlagali, da bi bile spremembe v velikosti celic morda lahko posledica motenj delitve celic, kot je bilo pokazano v primeru delovanja cinamaldehida na bakterijo *Bacillus cereus* (Domadia in sod., 2007).

Pri pregledovanju celic divjih tipov in adaptant s presevnim elektronskim mikroskopom smo opazili manjši delež celic, ki so bile svetlejše in bolj zaobljene kot večina. Celice so verjetno bile svetlejše zaradi slabše vezave uranil-acetata na njihovo površino, kar pomeni, da je bila površina teh celic drugačna. Uranil-acetat se veže na nukleinske kisline, fosfolipide in proteine, med katerimi so za obarvanje membran v večini odgovorni proteini (Hayat, 2000). Iz tega bi lahko sklepali, da imajo omenjene svetlejše celice na svoji površini manj proteinov ali pa so ti drugačni, saj je vezava uranil-acetata odvisna tudi od naboja proteinov. Glede na to, da so bile te celice bolj zaobljene in debelejše kot večina celic, so morda tvorile polisaharidni ovoj.

5.2.6 Odpornost proti antibiotikom

O odpornosti adaptant na ionoforne antibiotike proti drugim antibiotikom je malo znanega, saj so v večini raziskav preučevali odpornost bakterij, adaptiranih na ionofore, le proti drugim ionofornim antibiotikom. Rezultati raziskav so si nasprotujejoči. Chen in Wolin (1979) sta poročala, da mutante *P. brevis* GA33, odporne proti monenzinu, niso bile navzkrižno odporne proti lasalocidu in obratno. Tudi Morehead in Dawson (1992) sta ugotovila, da se občutljivost sevov *P. ruminicola* 23 in *P. brevis* GA33, adaptiranih na monenzin, proti lasalocidu in valinomicinu ne spremeni, seva pa sta postala bolj odporna proti nigericinu kot divja tipa. Ker poleg tega kombinacija dveh ionoforov uspešneje zavira rast kot posamezen ionofor in so za enak učinek potrebne nižje koncentracije, so sklepali, da se mehanizem odpornosti proti različnim ionoforom ali skupinam ionoforov razlikuje (Morehead in Dawson, 1992). Nasprotno so druge raziskave pokazale, da so celice *P. ruminicola* 23, *P. brevis* GA33, *P. bryantii* B₁₄ in *C. aminophilum* F, adaptirane na monenzin, bolj odporne proti lasalocidu kot divji tipi istih sevov (Callaway in Russell, 1999; Dawson in Boling, 1984; Houlihan in Russell, 2003).

V redkih študijah so preučevali odpornost bakterij adaptiranih na ionofore proti terapevtskim antibiotikom. Celice *P. bryantii* in *C. aminophilum*, ki so bile adaptirane na monenzin, so bile enako ali bolj občutljive proti 22 pogosto uporabljenim antibiotikom kot divja tipa obeh vrst (Houlihan in Russell, 2003; Russell in Houlihan, 2003). Enako so

pokazali za celice *C. aminophilum* F, ki so bile adaptirane na lasalocid. Bacitracin je bil edini antibiotik, pri katerem je bila minimalna inhibitorna koncentracija za sev *C. aminophilum* F, adaptiran na monenzin ali lasalocid, večja kot za divji tip (Houlihan in Russell, 2003). Večja odpornost proti bacitracinu bi lahko bila povezana z večjo količino ekstracelularnih polisaharidov, ki jih ta sev proizvaja v prisotnosti monenzina in je povezana z odpornostjo po Gramu negativnih bakterij proti istemu antibiotiku (Pollock in sod., 1994). Povečane odpornosti proti protimikrobnim snovem prav tako ni bilo opaziti pri bakterijah *E. coli* in *Salmonella Typhimurium*, izoliranih iz jagenjčkov, ki so prejemali monenzin (Edrington in sod., 2003).

Adaptanti *P. ruminicola* 23 sta bili enako, pogosto pa bolj občutljivi na preučevane terapevtske antibiotike kot divji tip, kar je v skladu z dosedanjimi ugotovitvami o odpornosti različnih bakterij, adaptiranih na ionoforne antibiotike. Izjema sta bila vankomicin in klaritromicin, katerih minimalna inhibitorna koncentracija je bila povprečno 3× oziroma 4× večja za adaptanto 23-150 kot za divji tip. Adaptanti *P. bryantii* B₁₄ sta bili na 21 testiranih antibiotikov enako ali manj občutljivi kot divji tip, kar je tudi v skladu s predhodnimi rezultati (Russell in Houlihan, 2003), proti devetim antibiotikom pa je bila vsaj ena izmed adaptant bolj odpora kot divji tip. Minimalna inhibitorna koncentracija antibiotikov, ki smo jih uporabili v obliki trakov in jo zato lahko ocenimo (CH, OX, TE, VA), je bila za adaptante povprečno 2-3× višja kot za divji tip. Odziv adaptant različnih vrst se razlikuje, saj so bile v nekaterih primerih adaptante seva B₁₄ enako ali bolj odporne proti določenemu antibiotiku kot divji tip B₁₄, medtem ko sta bili adaptanti seva 23 na isti antibiotik bolj občutljivi kot divji tip 23.

Po Gramu negativne bakterije so naravno odporne proti vankomicinu, ker težko prehaja skozi zunanjo membrano (French, 1998), vendar je bila odpornost adaptant na monenzin obeh vrst proti vankomicinu vseeno večja kot odpornost divjih tipov. Morda bi prehod vankomicina preko celične stene lahko dodatno otežila večja količina ekstracelularnih polisaharidov, ki jih *P. bryantii* proizvaja v prisotnosti monenzina (Callaway in Russell, 1999). Podobno je bilo predlagano v primeru povečane odpornosti bakterije *C. aminophilum*, ki je bila adaptirana na monenzin in ob tem tvorila več ekstracelularnih polisaharidov, proti bacitracinu (Houlihan in Russell, 2003; Rychlik in Russell, 2002). Tudi pri bakterijah *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* so ugotovili, da je večja odpornost proti monenzinu sovpadala z odebeleno celično steno ali glikokaliksom (Simjee in sod., 2012).

Med celicami divjih tipov in adaptant vrst *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 smo s presevnim elektronskim mikroskopom opazili manjši delež celic, ki so bile debelejše in bolj zaobljene od večine, kot bi bile obdane z ovojem. Zaradi šibkejše obarvanosti sklepamo, da imajo drugačno sestavo površine, vendar bi bilo potrebno raziskati ali je domnevni ovoj sestavljen iz polisaharidov. Nismo opazili, da bi bil delež takšnih celic pri

monenzinskih adaptantah večji kot pri divjih tipih, pogosteje pa so bile takšne celice prisotne v stacionarni kot v logaritemski fazi rasti, tako da je malo verjetno, da bi opisani izsledki prispevali k večji odpornosti proti monenzinu.

5.2.7 Spremembe v genskem zapisu adaptant

Da bi ugotovili, ali je sposobnost rasti v prisotnosti monenzina povezana s spremembami v genskem zapisu, smo sekvencirali genome divjih tipov *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 ter adaptant obeh vrst, ki sta rasli pri koncentraciji monenzina 150 µM, in jih med seboj primerjali. Našli smo 5 genskih sprememb, ki so bile značilne za adaptanto B₁₄-150 in 8 takšnih, ki so se pojavljale le v adaptanti 23-150, ne pa v divjem tipu iste vrste. V adaptantah različnih vrst se genske spremembe niso zgodile v enakih genih ali genih, katerih produkti sodelujejo v istih procesih.

Gene adaptante B₁₄-150, v katerih so se zgodile spremembe, težko povežemo s procesi, ki bi lahko prispevali k uspešnejši rasti v prisotnosti monenzina. Ker monenzin poruši gradiente protonov, kalijevih in natrijevih ionov, celice poskušajo izničiti učinek z delovanjem ATPaz in transporterjev, zaradi česar se energijsko izčrpajo. Zasledili smo dve spremembi v genu PBR_0708, ki kodira ATPazo, vendar ne moremo sklepati, kakšen vpliv imata na delovanje celice. K manjši občutljivosti na monenzin bi ATPaza pripomogla v primeru, da bi bilo zaradi genskih sprememb njeno delovanje učinkovitejše. Mutacija je bila prisotna tudi v genu PBR_1589, katerega produkt sodeluje pri sintezi maščobnih kislin, a kljub temu nismo ugotovili večjih sprememb v njihovem profilu. Najtežje je sklepati o posledicah genske spremembe v genu za transkripcijski regulator iz družine AraC (PBR_1710), saj regulatorji iz omenjene družine vplivajo na več procesov, kot so metabolizem ogljikovih hidratov, metabolizem dušika, odziv na stres in na virulenco (Gallegos in sod., 1997; Ibarra in sod., 2008).

V adaptanti 23-150 je prišlo do spremembe genskega zapisa v proteinu iz družine bakterijskih transferaz, ki je pomemben pri sintezi polisaharidov, pri kateri prenaša monosaharidne skupine. Glede na to, da so pri odpornosti proti monenzinu bakterij *P. bryantii* in *C. aminophilus* nekateri avtorji omenjali pomen ekstracelularnih polisaharidov (Callaway in Russell, 1999; Rychlik in Russell, 2002), bi morda sprememba v tem genu (PRU_1381) lahko prispevala k večji odpornosti seva 23.

Bakterije, ki proizvajajo ionoforne antibiotike, so proti njim naravno odporne, vendar natančen mehanizem odpornosti ni poznan. Gen, ki je povezan z odpornostjo *Streptomyces longisporoflavus* proti ionofornemu antibiotiku tetrofazinu, kodira ABC transporter, kar pomeni, da bi lahko bila odpornost povezana z aktivnim izčrpavanjem ionov iz celice (Russell in Houlihan, 2003). Med geni adaptante 23-150, v katerih so se zgodile mutacije, smo odkrili gen PRU_1932, ki kodira permeazo ABC transportnega sistema, vendar je ta

povezana s transportom protimikrobnih peptidov in ne protonov iz celice. Podobna domena je prisotna v proteinih MacB, ki iz celice transportirajo makrolidne antibiotike. Če ima transportni sistem ABC bakterije *P. ruminicola*, v katerem je prišlo do mutacije, enako vlogo, spremembu ni bistveno vplivala na odpornost proti makrolidnim antibiotikom, saj je adaptanta na azitromicin občutljiva bolj, na klaritromicin manj kot divji tip, v občutljivosti na eritromicin pa ni opaznih razlik.

V adaptanti 23-150 smo gensko spremembo odkrili tudi v genu PRU_0900, ki kodira transkripcijski terminacijski faktor Rho. Ta sodeluje v procesu terminacije transkripcije, ki jo imenujemo od Rho odvisna terminacija transkripcije, poznamo pa tudi od Rho neodvisno (Ciampi, 2006). Kot je opredeljeno v bazi KEGG, faktor Rho sodeluje tudi v procesu regulacije izražanja genov preko razgradnje mRNA kot del multiencimskega kompleksa, degradosoma. Ker sodeluje pri tako splošnih procesih, bi bil vpliv spremembe v genu PRU_0900 lahko zelo obsežen in bi lahko vplival na mnoge procese v celici, vendar se ne da predvideti, na katere. Prav tako bi lahko imela širok vpliv sprememba v genu za transkripcijski regulator GntR (PRU_1935), saj so takšni regulatorji pomembni v različnih celičnih procesih (NCBI, 2013). K večji odpornosti proti monenzinu bi morda lahko prispevala še spremembu v hipotetičnem proteinu PRU_2548, ki ima domeni, značilni za proteine, ki igrajo vlogo pri rasti bakterije v posebnih razmerah (NCBI, 2013), kamor bi lahko uvrstili tudi rast v prisotnosti antibiotika, vendar tudi tokrat ni možno predvideti posledic genske spremembe.

Pri primerjavi genomov divjih tipov in adaptant vrst *P. ruminicola* 23 in *P. bryantii* B14, ki smo jih sekvencirali, z referenčnima genomoma v bazi podatkov smo našli kar nekaj razlik. V sekvencah vrste *P. bryantii* je takšnih razlik okrog 200, v sekvencah *P. ruminicola* pa približno 90. Zanimalo nas je, ali je to število sprememb pričakovano. V evolucijski študiji, ki poteka že 25 let, so v laboratoriju Richarda Lenskija (Blount in sod., 2012) na Univerzi v Michiganu skoraj vsak dan precepljali kulturo *E. coli* v minimalno gojišče z glukozo, občasno pa iz zraslih kultur odvzeli vzorce in jih shranili za kasnejše analize. Nedavno so objavili članek, v katerem so prikazali rezultate genomskega sekvenciranja odvzetih vzorcev. Od začetka študije so v genomu 20.000. generacije odkrili 45 genskih sprememb, nato pa se je hitrost kopiranja mutacij povečala, saj so v zadnji, 40.000. generaciji odkrili 653 sprememb. Glede na zgodovino seva *P. bryantii* B14 vemo, da je bil ta sev izoliran v poznih petdesetih letih dvajsetega stoletja v ZDA (Bryant in sod., 1958), od tam pa razširjen tako po ZDA kot v nekatere druge države (Velika Britanija, Slovenija). Točnih podatkov o laboratorijski liniji seva, ki je bil v ZDA sekvenciran in je uporabljen kot referenčni genom, nimamo, precej dobro pa poznamo laboratorijsko zgodovino linije. Ta je preko Škotske v zgodnjih 1990 letih prišla v Slovenijo in bila ves čas gojena in precepljana kot eden od najpomembnejših raziskovalnih objektov na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete (Avguštin, 2013). Iz podatkov prej omenene študije bi torej sklepali, da je 200

sprememb v genomu v okviru pričakovanega števila sprememb v tem času. Čeprav sev B₁₄ niso gojili tako intenzivno kot *E. coli* v omenjeni študiji, pa je bil večkrat izpostavljen možnim stresnim razmeram, kot sta zamrzovanje ob shranjevanju in izpostavljenost kisiku ob precepljanju, saj gre za striktno anaerobno bakterijo. Poleg tega prevotele gojimo in so jih v preteklosti gojili v kompleksnem gojišču, ki vsebuje centrifugiran in avtoklaviran vampni sok, katerega sestave ne moremo kontrolirati. Bogato gojišče tudi dopušča kopiranje večjega števila mutacij, ki bi bile morda v minimalnem gojišču za bakterije usodne.

5.2.8 Narava odpornosti

O naravi odpornosti proti ionoformnim antibiotikom velja hipoteza, da je ta posledica adaptacije bakterij, ki temelji na fiziološkem in ne genetskem nivoju, saj se kot že omenjeno odpornost proti antibiotikom v čistih ali mešanih kulturah bakterij večkrat hitro izgubi. Nekateri raziskovalci menijo, da kultura *P. bryantii* verjetno vsebuje podpopulacijo celic, ki lahko postane zelo odporna proti monenzinu in predstavlja nekaj odstotkov celotne populacije celic (Callaway in Russell, 1999). Ko je monenzin prisoten, naj bi se namnožile in številčno prevladale celice, ki so bolj občutljive proti monenzinu, te pa naj bi prevladovale v razmerah, ko monenzina ni. Nasprotno sta Houlihan in Russell (2003) pokazala, da lahko praktično katerakoli celica *C. aminophilum* F postane odporna proti monenzinu in lasalocidu. Naši rezultati kažejo, da bi za adaptacijo na ionoforne antibiotike lahko obstajal genetski vzrok, saj se odpornost *P. bryantii* in *P. ruminicola* proti monenzinu ohrani dlje časa in v genomih adaptiranih bakterij pride do nekaterih genskih sprememb, ki bi lahko prispevale k uspešnejši rasti v prisotnosti monenzina, vendar bi bilo to potrebno podrobneje raziskati. Glede na to, da je odpornost bakterije *Streptomyces longisporoflavus*, ki proizvaja ionoformni antibiotik tetronezin, genetske narave (Linton in sod., 1994), bi bilo to možno tudi v primeru odpornosti proti monenzinu.

Rezultati naše raziskave kažejo, da se odzivi še tako sorodnih bakterij na prisotnost antibiotika lahko razlikujejo, kar otežuje preučevanje mehanizma odpornosti. Glede na to, da sta bili monenzinski adaptanti bakterije *P. bryantii* B₁₄ bolj odporni na več preučevanih antibiotikov kot divji tip iste vrste in da je adaptacija stabilna skozi čas, bi bila prepoved uporabe monenzina v Evropi lahko upravičena.

Sevi prevotel, ki smo jih preučevali v tej študiji, so bili izolirani iz vampa goveda. Vampne bakterije tok prebavne vsebine zanese preko prebiralnika (omasum) do siriščnika (abomasum), kjer so podvržene kisli in encimski hidrolizi. Možnosti preživetja vampnih bakterij in kolonizacije tankega ali debelega črevesa ni, kolikor nam je znano, preučeval še nihče. Katarina Tepšič je v svojem doktoratu (Tepšič, 2002) preučevala sestavo bakteroidet v fekalnih vzorcih goveda in ugotovila, da v fecesu prevladujejo drugi člani debla *Bacteroidetes*, predvsem bakterije iz rodu *Bacteroides*. Horizontalni genetski prenos med

temi bakterijami je možen, morda bi zanj zadostovalo majhno število vampnih prevotel, ki bi pripravale v zadnji del prebavnega trakta goveda ali celo njihova gola DNA. Bakteroidi lahko preko fekalnih odplak s farm prehajajo v vodo, kjer predstavljajo možen vir fekalnih okužb za ljudi. Layton in sodelavci (2006) so predlagali, da bi lahko informativne dele genoma bakterij iz rodu *Bacteroides* uporabili kot marker za fekalno onesnaženje voda. V primeru fekalno-oralne okužbe s takšnimi bakterijami, ki bi bile odporne proti monenzinu, bi te nato lahko izmenjale genski material z oralnimi vrstami prevotel. Dejstvo je, da v prevotelah še vedno ni znanih delujočih konjugativnih transpozonov. V naši študiji nobena mutacija, značilna za adaptanto *P. bryantii* B₁₄, ni nastala v CTnB₁₄, torej med regijama *tra* in GG, ki bi se lahko širila med bakterijami v primeru, če je konjugativni transpozon delujoč. Vseeno zaradi časovne omejenosti tega dela ne moremo popolnoma izključiti možnosti, da se odpornosti proti monenzinu lahko prenaša med bakterijami. Če obstaja možnost prenosa odpornosti proti monenzinu med bakterijami in sočasno tudi možnost razvoja in prenosa odpornosti proti nekaterim drugim antibiotikom, potem moramo ugotoviti, ali uporaba monenzina v živinoreji predstavlja sicer hipotetično, a možno nevarnost za zdravje ljudi. V tem primeru je vprašljiva ne le njegova uporaba kot krmnega dodatka druge po svetu, vendar tudi njegova uporaba pri preprečevanju kokcidioze pri rej perutnine, ki je v Evropi še vedno dovoljena in rutinsko izvajana.

6 SKLEPI

V *P. bryantii* B₁₄ smo z bioinformacijsko raziskavo odkrili hipotetičen konjugativni transpozon, podoben konjugativnima transpozonom CTnBST iz *B. uniformis* WH207 in CTn3-Bf iz *B. fragilis* YCH46. CTnB₁₄ je skoraj dvakrat daljši kot CTnBST in CTn3-Bf, vendar konca transpozona nismo odkrili. Omenjenim trem konjugativnim transpozonom sta skupni dve regiji, v katerih je vrstni red genov ohranjen, aminokislinska podobnost pa visoka. V regiji *tra* se nahajajo geni za prenos konjugativnega transpozona, v doslej neznani regiji GG pa pretežno hipotetični proteini in nekaj peptidov. Ti dve regiji sta bili ohranjeni tudi v genomih več drugih vrst iz rodu *Bacteroides*, razdalja med njima pa je različna.

Konjugativni transpozon CTnB₁₄ ima 178 bralnih okvirjev. Funkcijo smo uspeli pripisati 120 bralnim okvirjem, od katerih jih največji delež sodeluje pri metabolizmu enostavnih sladkorjev in polisaharidov. Kar 21 od 23 ORF iz te funkcionalne skupine je lociranih skupaj v eni regiji, njena organizacija pa spominja na PUL (ang. polysaccharide utilization loci) v bakterijah iz rodu *Bacteroides*.

Bakteriji *P. bryantii* B₁₄ in *P. ruminicola* 23 se na prisotnost monenzina v gojišču odzoveta na različna načina. Pri sevu B₁₄ pride do faze prilagajanja, ki je do neke mere povezana s koncentracijo monenzina (z višjo koncentracijo se čas prilagajanja podaljšuje), a sev zraste tudi pri zelo visoki koncentraciji monenzin kot je 1 mM, pri sevu 23 pa je opazna skoraj popolnoma inhibicija rasti pri koncentraciji monenzina 12,5 µM. Medtem ko se hitrost rasti B₁₄ v prisotnosti monenzina ne spremeni bistveno, sev 23 raste počasneje.

Adaptirani sevi 23-10, 23-150, B14-10 in B14-150 so tudi po 29 zaporednih precepljanjih v gojišču brez monenzina ob ponovni izpostavitvi monenzinu zrasli, pri sevu B₁₄ ni bilo opaznega zamika rasti kot ob prvotni izpostavljenosti monenzinu.

Deleži fermentacijskih produktov, tako plinov kot KMK, se med divjim tipom B₁₄ in adaptantama ne razlikujejo bistveno, med KMK prevladujeta acetna in jantarna kislina. Tudi adaptanti seva 23 proizvajata največ acetne in jantarne kisline, propionsko kislino ter zelo malo mlečne kisline, ki pa je glavni produkt divjega tipa 23. Nismo pričakovali, da bo delež mlečne kisline v profilu KMK divjega tipa *P. ruminicola* 23 tako velik, saj so v preteklih študijah ugotovili, da je bila glavni produkt seva 23 jantarна kislina, mlečna kislina pa le stranski produkt v manjših količinah. Razlike v izsledkih ne znamo pojasniti, morda je v laboratorijski zgodovini seva prišlo do genetske spremembe, ki je vplivala na pot fermentacije. Poleg tega divji tip 23 v nasprotju z adaptantama ne proizvaja propionske in zelo malo jantarne kisline. Pri nobeni vrsti med plinskimi produkti nismo zaznali H₂, le CO₂ in v majši meri N₂.

Pri vseh bakterijah v membrani prevladujeta maščobni kislini 15:0 anteizo in 16:00, ki skupaj predstavlja 55-64,7 % vseh analiziranih DMK pri posameznih sevih. Delež ostalih DMK ne presegajo 8 %, DMK, ki bi se pojavljale le v adaptantah, divjih sevih ali le v eni bakterijski vrsti, ni oziroma je njihov delež manjši od 0,6 %. Adaptante obenjak bakterijskih vrst imajo v membranah večji delež 16:00 in manjši delež 15:0 anteizo. Enak trend, čeprav šibek, je opazen pri vseh adaptantah: delež nasičenih razvejanih MK je manjši, nasičenih nerazvejanih MK pa večji kot v membranah divjih tipov. Prav tako imajo adaptante v membranah več nenasičenih MK.

S transmisijsko mikroskopijo smo ugotovili, da obstajajo določene razlike v širini in dolžini celic divjih tipov ter adaptant, vendar rezultati ne kažejo jasnega trenda v spremembi velikosti celice.

Adaptante seva B₁₄ so večkrat bolj odporne, adaptante seva 23 pa manj odporne kot divji tip proti testiranim antibiotikom.

Z bioinformacijsko analizo sekvenciranih genomov divjih tipov in adaptant na koncentracijo monenzina 150 µM smo odkrili 8 genetskih sprememb, ki se pojavljajo le v adaptanti 23-150 vrste *P. ruminicola* in 5 genetskih sprememb, ki se pojavljajo le v adaptanti B₁₄-150 vrste *P. bryantii*. Na osnovi odkritih mutacij nismo uspeli razložiti narave mehanizma odpornosti proti monenzinu oz. proti drugim preučevanim antibiotikom.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Bakterije iz rodov *Prevotella* in *Bacteroides* filogenetsko uvrščamo v deblo *Bacteroidetes*. Prve so pomembni predstavniki mikrobne združbe predvsem vampa prežvekovalcev, druge pa zadnjega dela prebavnega trakta človeka in živali. Prebavni trakt naseljuje veliko število mikroorganizmov, ki igrajo pomembno vlogo tako v procesih razgradnje hrane kot v procesih imunskega sistema. Aktivnost in funkcija mikroorganizmov je v energetskem smislu pomembna predvsem v predželodcih rastlinojedih živali, na primer v vampu goveda. Kljub temu, da so bakterije iz rodu *Prevotella* v vampu zastopane v zelo velikem številu in sodelujejo v mnogih pomembnih procesih, predvsem razgradnji rastlinskih polisaharidov, jih slabo poznamo, saj do sedaj izolirani sevi predstavljajo le manjši delež bakterij iz tega rodu v naravi. Tudi bakterije iz rodu *Bacteroides* so saharolitične, nekatere vrste so pomembni oportunistični patogeni. Rodova se razlikujeta od drugih dobro poznanih po Gramu negativnih bakterij (npr. proteobakterij) predvsem po drugačni, a še vedno slabo preučeni genetiki. Njihovo preučevanje tako otežuje pomanjkanje primernih orodij za gensko manipulacijo.

Ena od genetskih značilnosti bakterij iz rodu *Bacteroides* so veliki konjugativni transpozoni, ki so pomembni pri razširjanju genov za odpornost proti antibiotikom. Kljub temu, da so jih raziskovalci odkrili v dobršnem delu preučevanih izolatov iz tega rodu, pa v sorodnih bakterijah iz rodu *Prevotella* še niso bili opisani. Nekatere raziskave so nakazovale na možnost obstoja konjugativnega transpozona v bakteriji *P. bryantii* B₁₄, zato smo se odločili, da ga poskušamo odkriti in opisati. Z bioinformacijsko analizo smo v genomu seva B₁₄ potrdili obstoj dveh regij, katerih vrstni red je ohranjen, aminokislinsko zaporedje pa zelo podobno tistim v konjugativnih transpozonih CTnBST iz vrste *Bacteroides uniformis* WH207 in CTn3-Bf iz *Bacteroides fragilis* YCH46. Prva ohranjena regija je regija *tra*, v kateri so strnjeni geni za prenos konjugativnega transpozona in leži na njegovem začetku, proti koncu transpozona pa smo odkrili regijo, ki smo jo poimenovali regija GG in v kateri leži več hipotetičnih proteinov in nekaj peptidaz. Natančnega konca hipotetičnega konjugativnega transpozona iz seva B₁₄, poimenovanega CTnB₁₄, ne poznamo, regiji *tra* in GG pa sta ohranjeni v več vrstah *Bacteroides*, kar kaže na razširjenost podobnih elementov. Med ohranjenima regijama CTnB₁₄ leži večja skupina genov za metabolizem sladkorjev in polisaharidov, ki spominja na lokuse za koriščenje polisaharidov (ang. polysaccharide utilization loci) v vrstah *Bacteroides*. Ali je CTnB₁₄ sposoben prenosa v drugo celico ne vemo, bi pa to prispevalo k lažjemu preučevanju in manipulaciji bakterij v rodu *Prevotella*.

Genska manipulacija vamnih bakterij že nekaj časa budi zanimanje, ker bi s spremenjeno mikrobnjo združbo lahko dosegli večji izkoristek krme in posledično hitrejšo rast pri reji

živali. Za ta namen rejci uporabljajo različne krmne dodatke kot so npr. antibiotiki. Predvsem pri reji prežvekovalcev se kot krmni dodatek uporabljajo ionoforni antibiotiki, ki služijo za manipulacijo mikrobne združbe vampa, da bi ta pri hidrolizi rastlinskih polisaharidov proizvajala manj stranskih produktov, kot je npr. okoljsko škodljivi metan in več kratkoverižnih maščobnih kislin, ki jih gostitelj uporabi za rast in razvoj. Zaradi bojazni pred razširjanjem odpornosti proti antibiotikom, je Evropska unija leta 2006 prepovedala uporabo vseh antibiotikov kot krmnih dodatkov, kar je povzročilo rast stroškov reje. Raziskave so se usmerile v iskanje alternativnih krmnih dodatkov, vendar do sedaj niso odkrile učinkovite alternative ionofornim antibiotikom.

Zaradi dvomov o utemeljenosti prepovedi uporabe ionofornih antibiotikov in slabemu poznavanju mehanizma odpornosti, smo se odločili, da poskusimo raziskati mehanizem odpornosti proti monenzinu vamnih bakterij *Prevotella bryantii* B₁₄ in *Prevotella ruminicola* 23. Primerjali smo fenotipske, metabolne in genetske značilnosti divjih tipov in adaptiranih različic, ki so rasle pri koncentraciji monenzina 10 ali 150 µM.

Rast divjih tipov omenjenih vrst ob prisotnosti monenzina se razlikuje. Hitrost rasti seva B₁₄ se z višino koncentracije monenzina ne spremeni bistveno, medtem ko se hitrost rasti seva 23 upočasni že pri zelo nizkih koncentracijah. Poleg tega je rast seva 23 močno inhibirana že pri koncentraciji monenzina 12,5 µM, sev B₁₄ pa zraste tudi pri koncentraciji monenzina 1 mM, vendar se s koncentracijo monenzina spreminja faza prilagajanja. S postopnim precepljanjem v gojišče z višjo koncentracijo monenzina smo vzgojili adaptanto 23-150, ki je rasla pri koncentraciji monenzina 150 µM, kulturo seva 23, ki je zrasla pri koncentraciji 10 µM, pa smo vedno gojili pri tej koncentraciji. Prav tako smo sev B₁₄ gojili pri dveh koncentracijah monenzina, 10 in 150 µM. Da bi preverili, ali se adaptacija ohrani, smo adaptirane seve gojili v gojišču brez monenzina in jih nato precepili ponovno v gojišče s koncentracijo monenzina, pri kateri so rastli pred tem. Tudi po 29 precepljanjih v gojišču brez monenzina so sevi v njegovi prisotnosti zrasli.

Ker monenzin vpliva na metabolizem bakterij in se veže na membrano, smo s plinsko kromatografijo analizirali sestavo kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK), plinov in membranskih dolgoverižnih maščobnih kislin (DMK). Pri sevu B₁₄ nismo opazili bistvene razlike v deležu fermentacijskih produktov med divjim tipom in adaptantama, ocetna in jantarna kislina sta predstavljeni več kot 97,2 % vseh KMK. Tudi pri adaptantah seva 23 sta prevladovali ocetna in jantarna kislina, poleg tega sta seva proizvedla znaten delež propionske in zelo malo mlečne kisline. Nasprotno med KMK pri divjem tipu prevladujeta mlečna (70,6 %) in ocetna (27,9 %) kislina, propionske kisline pa nismo zaznali. V plinski atmosferi vseh bakterijskih kultur smo zaznali le CO₂ in nekaj odstotkov N₂, ne pa H₂. V membranah divjih tipov in adaptant prevladujeta DMK 15:0 anteizo in 16:0:0, ki skupaj predstavlja več kot 55 % vseh analiziranih DMK, deleži ostalih DMK pa ne presegajo 8 %. DMK, ki bi bile značilne le za adaptante, divja tipa ali eno bakterijski vrsto nismo

zaznali oziroma je bil njihov delež manjši od 0,6 %. Adaptante obeh bakterijskih vrst imajo v membranah večji delež 16:00 in manjši delež 15:0 anteizo kot divja tipa. Trend sprememb skupin DMK je enak pri vseh adaptantah. Delež nasičenih razvejanih MK je za 4,4-12,5 % manjši, nasičenih nerazvejanih MK pa za 3,8-5,9 % večji kot v membranah divjih tipov. Prav tako imajo adaptante v membranah za 0,6-7,3 % več nenasičenih MK.

V širini in dolžini celic adaptant in divjih sevov, ki smo jih izmerili na fotografijah, pridobljenih s presevno elektronsko mikroskopijo s tehniko negativnega kontrastiranja, nismo odkrili sprememb, ki bi nakazovale trend povečevanja ali zmanjševanja adaptant na monenzin v primerjavi z divjimi sevi.

Z gojenjem organizmov na trdnem gojišču ter uporabo antibiotskih diskov in trakov smo ugotovili, da so adaptante (ena ali obe) seva B₁₄ bolj odporne proti 9 in bolj občutljive na 2 od 30 testiranih antibiotikov, adaptante (ena ali obe) seva 23 pa bolj občutljive na 14 in bolj odporne proti 2 od 30 testiranih antibiotikov.

Po bioinformacijski obdelavi in primerjavi genomskih divjih tipov in adaptant B14-150 ter 23-150 z ustreznim referenčnim genomom iz baze NCBI smo odkrili 87-229 razlik v posameznem genomu. Po ročnem pregledu razlik z referenčnim genomom, ki so prisotne le v posamezni adaptanti, ne pa v divjem sevu, smo našli 8 razlik značilnih za 23-150 in 5 razlik, ki so prisotne le v B₁₄-150. Nobena od mutacij se ni zgodila v genih ohranjenih regij CTnB₁₄ ali v regiji med njima.

7.2 SUMMARY

Bacteria from genera *Prevotella* and *Bacteroides* are members of phylum *Bacteroidetes* and are abundant in gastrointestinal tract of ruminants and other animals, including humans. Gastrointestinal tract is one of the most densely populated microbial ecosystems, and microorganisms play there an important role in degradation of food and affect immune system. As for energy production microorganisms are especially important in forestomach of ruminants, e.g. in cattle. Although bacteria from the genus *Prevotella* are abundant in the rumen and important for degradation of plant polysaccharides, very little is known about their genetics due to a relatively small number of isolated strains when compared with their abundance and obvious diversity in natural environments. Bacteria from genus *Bacteroides* are also saccharolytic, some of them are important opportunistic pathogens. The genetics of both genera is different from genetics of well-known bacteria, such as *Proteobacteria*. Research of these bacteria is slowed down due to lack of tools for genetic manipulation.

One of the genetic characteristics of *Bacteroides* is the existence of long conjugative transposons (CTns), which are important in dissemination of antibiotic resistances. Even

though they are abundant in genus *Bacteroides*, they have not been yet described in *Prevotella* species. Some researches indicated the possible presence of conjugative transposon in *Prevotella bryantii* B₁₄, therefore we decided to explore its existence. In the genome of B₁₄ we discovered and described a hypothetical conjugative transposon, named CTnB₁₄, which is related to conjugative transposons CTnBST from *Bacteroides uniformis* WH207 and CTn3-Bf from *Bacteroides fragilis* YCH46. All three CTns share *tra* regions and newly discovered GG regions with high amino acid identity and clearly conserved gene order. There are more related CTns in other *Bacteroides* species. A cluster of genes involved in sugar utilization and metabolism was discovered within the hypothetical CTnB₁₄, to a certain extent resembling the polysaccharide utilization loci in *Bacteroides* strains. We do not know whether the CTnB₁₄ is functional, but if it were, it would be helpful in genetic manipulation and investigation of prevotellas.

Manipulation of rumen bacteria is an interesting field, since changed rumen microbiota may be more efficient in forage degradation and as a consequence feed efficiency or growth rate in animal production would be higher. For this purpose antibiotics are often used as feed additives, in cattle breeding particularly the ionophore antibiotics, which change rumen microbial community in a way that it produces less waste products, such as methane, and more short-chain fatty acids (SCFAs), which are used by the host. Due to fear of dissemination of antibiotic resistances, the European Union in 2006 banned the use of all antibiotics as feed additives in animal breeding, which caused the raise of breeding costs. Researches searched for alternative feed additives, but none of them was as efficient as ionophore antibiotics.

Because the exact mechanism of bacterial resistance to monensin is not understood and the ideas about the lateral transfer of the monensin resistance among gut bacteria lack evidence, our aim was to investigate possible resistance mechanism in bacteria *P. bryantii* B₁₄ and *P. ruminicola* 23. Phenotypic, metabolic and genetic characteristics of wild type strains B₁₄ and 23 were compared to those of the same strains adapted to 10 or 150 µM monensin.

Monensin does not affect growth of wild type 23 and B₁₄ in the same way. Growth rate of B₁₄ does not change much with higher monensin concentration, whereas the growth rate of 23 is hampered already by very low concentrations of monensin in the medium. Furthermore, growth of strain 23 was strongly inhibited by monensin concentration as low as 12,5 µM, whereas strain B₁₄ grew in the presence of 1 mM monensin, but lag phase was observed. Strain 23 was successfully adapted to 150 µM of monensin (23-150) by transferring the strain subsequently in medium with gradually increasing monensin concentrations. The rest of the experiments was performed with cultures, that grew immediately in the presence of monensin i.e. (23-10, B14-10, B14-150). After 29 transfers

of adapted strains in medium without monensin growth in the presence of monensin was still observed, which indicates the genetic nature of the phenomenon.

Since monensin affects bacterial metabolism and binds to bacterial membranes, we have analysed fermentation products and membrane long-chain fatty acids of adapted and wild type strains. Significant differences in SCFA profiles of cultures of strain *P. bryantii* B₁₄ were not discovered, the major SCFAs were acetic and succinic acids, together representing more than 97,2 % of all SCFA analysed. Beside acetic and succinic acid the adapted strains of *P. ruminicola* 23 also produced a significant share of propionic, but no lactic acid. Contrary, the wild type of strain 23 produced mostly lactic (70,6 %) and acetic acid (27,9 %), but no propionic. Gas phase of all the strains contained almost exclusively CO₂ and a few percents of N₂, but we did not detect any H₂. In the membranes of wild types and adapted strains fatty acids 15:0 anteiso and 16:0:0 prevailed (> 55 %) and shares of other LCFAs (long-chain fatty acids) were smaller than 8 %. We found no LCFAs, which would be present only in wild type, adapted strains or just in one strain and would represent more than 0,6 % of all LCFAs. Adapted strains of both species had greater content of 16:0:0 and smaller content of 15:0 anteiso than the wild types. Changes of LCFA groups are very similar for all adapted strains compared to wild types: share of branched-saturated fatty acids is 4,4-12,5 % smaller, share of straight- saturated fatty acids is 3,8-5,9 greater and share of unsaturated fatty acids is 0,6-7,3 % greater than that of wild types.

Length and width of the cells were measured in photographies obtained with transmission electronic microscopy. Certain differences in dimensions of the cells were observed, but we could not find any trends comparing the wild type and adapted strains.

Bacteria were cultured on agar plates with antibiotics discs or E-tests to detect potential cross-resistance of adapted strains to other antibiotics. To 9 out of 30 antibiotics at least one adapted strain of B₁₄ was less sensitive and to 2 of 30 antibiotics more sensitive than the wild type strain. In the case of the strain 23 both adapted cultures were more sensitive than the wild type to 12 out of 30 antibiotics tested. 23-150 was more sensitive to two more antibiotics, but in two cases also less sensitive than the wild type.

Sequencing and comparison of B₁₄, B₁₄-150, 23 and 23-150 genomes to the reference genomes of each species deposited in public database revealed 87-229 variations in sequenced genomes. After manual examination of variations which were present only in adapted strains, 8 variations were confirmed in *P. ruminicola* 23-150 and 5 in *P. bryantii* B₁₄ genome. The analysis of the observed differences, putative mutations, didn't make possible the explanation of the resistance mechanisms. None of the mutations happened in the CTnB₁₄ region.

8 VIRI

- Aarestrup F.M. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. APMIS : Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 108, Suppl. 101: 5-48
- Aarestrup F.M., Bager F., Jensen N.E., Madsen M., Meyling A., Wegener H.C. 1998. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. APMIS : Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica, 106, 6: 606–622
- Abd-Elsalam K.A. 2003. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. African journal of biotechnology, 2, 5: 91–95
- Abràmoff M.D., Magalhães P.J., Ram S.J. 2004. Image processing with ImageJ. Biophotonics international, 11, 7: 36–42
- Accetto T., Avguštin G. 2007. Studies on *Prevotella* nuclease using a system for the controlled expression of cloned genes in *P. bryantii* TC1-1. Microbiology, 153: 2281–2288
- Accetto T., Avguštin G. 2011. Inability of *Prevotella bryantii* to form a functional Shine-Dalgarno interaction reflects unique evolution of ribosome binding sites in Bacteroidetes. PloS one, 6, 8: e22914
- Accetto T., Peterka M., Avguštin G. 2005. Type II restriction modification systems of *Prevotella bryantii* TC1-1 and *Prevotella ruminicola* 23 strains and their effect on the efficiency of DNA introduction via electroporation. FEMS microbiology letters, 247, 2: 177–83
- Altenbach S.B., Townsend J.A. 1995. Transgenic plants with improved protein quality. V: Biotechnology in animal feeds and animal feeding. Wallace J.R., Chesson A. (eds.). New York, VCH publishers: 71-92
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of molecular biology, 215, 3: 403–10
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, 25, 17: 3389–3402
- Andam C.P., Williams D., Gogarten J.P. 2010. Natural taxonomy in light of horizontal gene transfer. Biology & philosophy, 25, 4: 589–602
- Arzese A.R., Tomasetig L., Botta G.A. 2000. Detection of *tetQ* and *ermF* antibiotic resistance genes in *Prevotella* and *Porphyromonas* isolates from clinical specimens and resident microbiota of humans. The journal of antimicrobial chemotherapy, 45, 5: 577–582
- Ashelford K.E., Weightman A.J., Fry J.C. 2002. PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with the RDP-II database. Nucleic acids research, 30, 15: 3481–3489

- Avguštin G. 2013. "Zgodovina sevov *P. ruminicola* in *P. bryantii*". Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (osebni vir, september 2013)
- Avguštin G., Ramšak A., Peterka M. 2001. Systematics and evolution of ruminal species of the genus *Prevotella*. *Folia microbiologica*, 46, 1: 40–44
- Avguštin G., Wallace R.J., Flint H.J. 1997. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 2: 284–288
- Avguštin G., Wright F., Flint H.J. 1994. Genetic diversity and phylogenetic relationships among strains of *Prevotella (Bacteroides) ruminicola* from the rumen. *International journal of systematic bacteriology*, 44, 2: 246–255
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Struhl K. 1987. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons: 376 str.
- Bäckhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307: 1915–1920
- Blount Z.D., Barrick J.E., Davidson C.J., Lenski R.E. 2012. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature*, 489: 513–517
- Brown J.R. 2003. Ancient horizontal gene transfer. *Nature reviews. Genetics*, 4, 2: 121–132
- Bryant M.P., Small N., Bouma C., Chu H. 1958. *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amyolytica* the new genus and species. *Journal of bacteriology*, 76, 1: 15–23
- BSAC methods for antimicrobial susceptibility testing. Version 11.1. 2012. British society for antimicrobial chemotherapy.
<http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/Version-11.1-2012-Final-.pdf> (4. sep. 2012)
- Butaye P., Devriese L.A., Haesebrouck F. 2001. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45, 5: 1374–1378
- Callaway T.R., Adams K.A., Russell J.B. 1999. The ability of “low G + C gram-positive” ruminal bacteria to resist monensin and counteract potassium depletion. *Current microbiology*, 39, 4: 226–30
- Callaway T.R., Russell J.B. 1999. Selection of a highly monensin-resistant *Prevotella bryantii* subpopulation with altered outer membrane characteristics. *Applied and environmental microbiology*, 65, 11: 4753–4759
- Callaway T.R., Russell J.B. 2000. Variations in the ability of ruminal Gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. *Current microbiology*, 40, 3: 185–189
- Chapman H.D., Jeffers T.K., Williams R.B. 2010. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. *Poultry science*, 89, 9: 1788–1801
- Chen M., Wolin M.J. 1979. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 38, 1: 72–77

- Chow J.M., Russell J.B. 1990. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. *Applied and environmental microbiology*, 56, 6: 1588–1593
- Cingolani P., Platts A., Coon M., Nguyen T. 2012. Program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso. *Fly*, 2, 6: 1–13
- Cohan F.M., Koeppel A.F. 2008. The origins of ecological diversity in prokaryotes. *Current biology*, 18, 21: R1024–34
- Dawson K.A., Boling J.A. 1983. Monensin-resistant bacteria in the rumen of calves on monensin-containing and unmedicated diets. *Applied and environmental microbiology*, 46, 1: 160–164
- Dawson K.A., Boling J.A. 1984. Factors affecting resistance of monensin-resistant and sensitive strains of *Bacteroides ruminicola*. *Canadian journal of animal science*, 64, 5: 132–133
- Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical pharmacology*, 74, 6: 831–840
- Donoho A.L. 1984. Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. *Journal of animal science*, 58, 6: 1528–1539
- Dutta C., Pan A. 2002. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. *Journal of biosciences*, 27, 1, Suppl 1: 27–33
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 5728: 1635–1638
- Edrington T.S., Callaway T.R., Varey P.D., Jung Y.S., Bischoff K.M., Elder R.O., Anderson R.C., Kutter E., Brabban A.D., Nisbet D.J. 2003. Effects of the antibiotic ionophores monensin, lasalocid, laidlowycin propionate and bambermycin on *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 in vitro. *Journal of applied microbiology*, 94, 2: 207–213
- Edwards J.E., McEwan N.R., Travis A.J., Wallace J.R. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 3: 263–281
- Fahey G.C.Jr., Bourquin L.D., Titgemeyer E.C., Atwell D.G. 1993. Postharvest treatment of fibrous feedstuff to improve their nutritive value. V: Forage cell wall structure and digestibility. Jung H.G., Buxton D.R., Hatfield R.D., Ralph J. (eds.). Madison, ASA-CSSA-SSSA: 717–766
- Ferme D. 2008. Vpliv izvlečkov česna in cimeta ter kostanjevih taninov na strukturo mikrobne združbe iz prebavnega traktas prežvekovalcev in kuncev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 261 str.
- Ferme D., Malneršič M., Lipoglavšek L., Kamel C., Avguštin G. 2008. Effect of sodium monensin and cinnamaldehyde on the growth and phenotypic characteristics of *Prevotella bryantii* and *Prevotella ruminicola*. *Folia microbiologica*, 53, 3: 204–208

- Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Kosheleva I.A., Boronin A.M. 2010. Horizontal transfer of catabolic plasmids and naphthalene biodegradation in open soil. *Microbiology*, 79, 2: 184–190
- Flint H., Stewart C. 1987. Antibiotic resistance patterns and plasmids of ruminal strains of *Bacteroides ruminicola* and *Bacteroides multiacidus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 26, 5: 450–455
- French G.L. 1998. Enterococci and vancomycin resistance. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious diseases society of America*, 27, Suppl. 1: S75–83
- Gallegos M., Schleif R., Bairoch A., Hofmann K., Ramos J.L. 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61, 4: 393–410
- Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312, 5778: 1355–1359
- Gorenc G., Accetto T., Avguštin G. 2009. The search for conjugative transposon in rumen bacterium *Prevotella bryantii* B₁₄. *Acta agriculturae Slovenica*, 94, 2: 147–152
- Gorenc K., Accetto T., Avguštin G. 2012. Bioinformatic evidence and characterization of novel putative large conjugative transposons residing in genomes of genera *Bacteroides* and *Prevotella*. *Folia microbiologica*, 57, 4: 285–290
- Guiney D.G., Bouic K. 1990. Detection of conjugal transfer systems in oral, black-pigmented *Bacteroides* spp. *Journal of bacteriology*, 172, 1: 495–497
- Gupta A., Vlamakis H., Shoemaker N., Salyers A.A. 2003. A new *Bacteroides* conjugative transposon that carries an *ermB* gene. *Society*, 69, 11: 6455–6463
- Halpin C., Foxon G.A., Fentem P.A. 1995. Transgenic plants with improved energy characteristics. V: *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH publishers: 279–294
- Hartl D.L. 2014. Essential genetics: a genomics perspective. 6th ed. Burlington, Jones & Bartlett publishers: 572 str.
- Hayashi H., Sakamoto M., Kitahara M., Benno Y. 2006. Diversity of the *Clostridium coccoides* group in human fecal microbiota as determined by 16S rRNA gene library. *FEMS microbiology letters*, 257, 2: 202–207
- Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. V: *Methods in microbiology*. Vol. 3B. Norris J.R., Ribbons D.W. (eds.). New York, Academic press: 133–149
- Holdeman L.V., Moore W.E.C., Cato E.P. 1977. *Anaerobe laboratory manual*. 4th ed. Blacksburg, Virginia polytechnic institute and State University: 152 str.
- Holmes R. K., Jobling M.G. 1996. Genetics. V: *Medical Microbiology*. Samuel Baron (ed.). 4th ed. Galveston, The University of Texas medical branch at Galveston <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7908/#473> (okt. 2009)

- Houlihan A.J., Russell J.B. 2003. The susceptibility of ionophore-resistant *Clostridium aminophilum* F to other antibiotics. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 52, 4: 623–628
- Ibarra J.A., Pérez-Rueda E., Segovia L., Puente J.L. 2008. The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. Genetica, 133, 1: 65–76
- Jain R., Rivera M.C., Lake J.A. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. Proceedings of the National academy of sciences, 96, 7: 3801–3806
- Kaneda T. 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiological reviews, 55, 2: 288–302
- KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. 1995-2013. Kanehisa laboratories. <http://www.genome.jp/kegg/> (okt. 2008 - sep. 2013)
- Kelley L.A., Sternberg M.J.E. 2009. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. Nature protocols, 4, 3: 363–371
- Kelly B.G., Vespermann A., Bolton D.J. 2009. Gene transfer events and their occurrence in selected environments. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British industrial biological research association, 47, 5: 978–983
- Krause D.O., Denman S.E., Mackie R.I., Morrison M., Rae A.L., Attwood G.T., McSweeney C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS microbiology reviews, 27, 5: 663–693
- Krieg N.R., Ludwig W., Euzéby J., Whitman W.B. 2010. Phylum XIV. *Bacteroidetes* phyl. nov. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. 2nd ed. Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W.B., Hedlund B.P., Paster B.J., Brown D.R., Staley J.T., Ward N.L. (eds.). New York, Springer: 25–469
- Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma V.K., Srivastava T.P., Taylor T.D., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich D.S., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., Hayashi T., Hattori M. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, 14, 4: 169–181
- Kuwahara T., Yamashita A., Hirakawa H., Nakayama H., Toh H., Okada N., Kuhara S., Hattori M., Hayashi T., Ohnishi Y. 2004. Genomic analysis of *Bacteroides fragilis* reveals extensive DNA inversions regulating cell surface adaptation. Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America, 101, 41: 14919–14924
- Lal S., Cheema S., Kalia V.C. 2008. Phylogeny vs. genome reshuffling: horizontal gene transfer. Indian journal of microbiology, 48, 2: 228–242
- Lana R.P., Russell J.B. 1996. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. Applied and environmental microbiology, 62, 12: 4499–4503

- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGgettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23, 21: 2947–2948
- Layton A., McKay L., Williams D., Garrett V., Gentry R., Sayler G. 2006. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. Applied and environmental microbiology, 72, 6: 4214-4224
- Li H., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 25, 14: 1754–1760
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics, 25, 16: 2078–2079
- Linton K.J., Cooper H.N., Hunter S., Leadlay P.F. 1994. An ABC-transporter from *Streptomyces longisporoflavus* confers resistance to the polyether-ionophore antibiotic tetrodronasin. Molecular microbiology, 11, 4: 777–785
- Lohse M., Bolger A.M., Nagel A., Fernie A.R., Lunn J.E., Stitt M., Usadel B. 2012. RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. Nucleic acids research, 40 (Web Server issue): W622-627
- Łowicki D., Huczyński A. 2013. Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: summary of the achievements. BioMed research international, 2013: 742149
- Marinšek-Logar R. 1992. Vpliv razdalje med sintrofnimi partnerji na metanogeno aktivnost v modelnih alginatnih kroglicah. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 112 str.
- Marinšek Logar R., Zorec M., Kopečný J. 2001. Reliable identification of *Prevotella* and *Butyrivibrio* spp. from rumen by fatty acid methyl ester profiles. Folia microbiologica, 46, 1: 57–59
- Martens E.C., Chiang H.C., Gordon J.I. 2008. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. Cell host & microbe, 4, 5: 447–457
- Miyagawa E. 1982. Cellular fatty acid and fatty aldehyde composition of rumen bacteria. Journal of general and applied microbiology, 28: 389–408
- Morehead M.C., Dawson K.A. 1992. Some growth and metabolic characteristics of monensin-sensitive and monensin-resistant strains of *Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola*. Applied and environmental microbiology, 58, 5: 1617–1623
- Nagaraja T.G., Newbold C.J., Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1997. Manipulation of rumen fermentation. V: The rumen microbial ecosystem. Hobson P.N., Stewart C.S. (eds.). 2nd ed. London, Blackie academic & professional, an imprint of Chapman & Hall: 523-632

- Nakhamchik A., Wilde C., Chong H., Rowe-Magnus D.A. 2010. Evidence for the horizontal transfer of an unusual capsular polysaccharide biosynthesis locus in marine bacteria. *Infection and immunity*, 78, 12: 5214–5222
- NCBI (National center for biotechnology information).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (okt. 2008 - sep. 2013)
- Neish A.S. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136, 1: 65–80
- Nikolich M.P., Hong G., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 1994a. Evidence for natural horizontal transfer of *tetQ* between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Applied and environmental microbiology*, 60, 9: 3255–3260
- Nikolich M.P., Shoemaker N.B., Wang G.R., Salyers A.A. 1994b. Characterization of a new type of *Bacteroides* conjugative transposon, Tcr Emr 7853. *Journal of bacteriology*, 176, 21: 6606–6612
- Norman A., Hansen L.H., Sørensen S.J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical transactions of the Royal society of London. Series B, Biological sciences*, 364, 1527: 2275–2289
- Ochman H., Lawrence J.G., Groisman E.A. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405, 6784: 299–304
- Ogata K., Aminov R.I., Nagamine T., Benno Y., Sekizaki T., Mitsumori M., Minato H., Itabashi H. 1996. Structural organization of pRAM4, a cryptic plasmid from *Prevotella ruminicola*. *Plasmid*, 35, 2: 91–97
- OligoAnalyzer 3.1. Integrated DNA technologies.
<http://eu.idtdna.com/analyizer/applications/oligoanalyzer/> (okt. 2008)
- Osborn A.M., Böltner D. 2002. When phage, plasmids, and transposons collide: genomic islands, and conjugative- and mobilizable-transposons as a mosaic continuum. *Plasmid*, 48, 3: 202–212
- Peterka M. 2002. Opis lokusov rrn bakterijskih vrst *Prevotella ruminicola* in *Prevotella bryantii*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 96 str.
- Pollock T.J., Thorne L., Yamazaki M., Mikolajczak M.J., Armentrout R.W. 1994. Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *Journal of bacteriology*, 176, 20: 6229–6237
- Quinlan A.R., Hall I.M. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26, 6: 841–842
- Ramšak A., Peterka M., Tajima K., Martin J.C., Wood J., Johnston M.E.A., Aminov R.I., Avguštin G. 2000. Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS microbiology ecology*, 33, 1: 69–79
- Reilly K., Carruthers V.R., Attwood G.T. 2002. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microbial ecology*, 43, 2: 259–270

- Roberts A.P., Mullany P. 2005. The conjugative transposons: integrative gene transfer elements. V: The dynamic bacterial genome. Mullany P. (ed.). New York, Cambridge University press: 207-233
- Rogers M., Jouany J.P., Thivend J.P., Fontenot J.P. 1997. The effects of short-term and long-term monensin supplementation and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. Animal feed science and technology, 65: 113-127
- Russell J.B. 1987. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminant bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. Journal of animal science, 64, 5: 1519-1525
- Russell J.B., Houlihan A.J. 2003. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. FEMS microbiology reviews, 27, 1: 65-74
- Rutherford K., Parkhill J., Crook J., Horsnell T., Rice P., Rajandream M.A., Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics, 16, 10: 944-945
- Rutkowski J., Brzezinski B. 2013. Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. BioMed research international, 2013: 162513
- Rychlik J.L., Russell J.B. 2002. The adaptation and resistance of *Clostridium aminophilum* F to the butyryvibriocin-like substance of *Butyryvibrio fibrisolvens* JL5 and monensin. FEMS microbiology letters, 209, 1: 93-98
- Salyers A.A., Gupta A., Wang Y. 2004a. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends in microbiology, 12, 9: 412-416
- Salyers A.A., Whittle G., Shoemaker N.B. 2004b. Conjugative and mobilizable transposons. V: Microbial evolution: gene establishment, survival and exchange. Miller R.V., Day M.J. (eds.). Washington, D.C., ASM press: 125-142
- Salyers A.A., Moon K., Schlesinger D. 2007a. The human intestinal tract-a hotbed of resistance gene transfer? Part II. Clinical Microbiology Newsletter, 29, 4: 25-30
- Salyers A.A., Moon K., Schlesinger D. 2007b. The human intestinal tract-a hotbed of resistance gene transfer? Part I. Clinical Microbiology Newsletter, 29, 3: 17-21
- Salyers A.A., Shoemaker N.B., Li L.Y. 1995a. In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. Journal of bacteriology, 177, 20: 5727-5731
- Salyers A.A., Shoemaker N.B., Stevens A.M., Li L.Y. 1995b. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiological reviews, 59, 4: 579-590
- Sambrook J., Russel D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 1. 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor laboratory press: 999 str.
- Saunier K. 2005. Enumeration of bacteria from the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota using Clep1156 16S rRNA probe in combination with helper and competitor oligonucleotides. Systematic and applied microbiology, 28, 5: 454-464
- Schlesinger D.J., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 2007. Possible origins of CTnBST, a conjugative transposon found recently in a human colonic *Bacteroides* strain. Applied and environmental microbiology, 73, 13: 4226-4233

- Schwab C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. V: Biotechnology in animal feeds and animal feeding. Wallace R.J., Chesson A. (eds.). New York, VCH publishers: 115-141
- Scott K. 2002. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. Cellular and molecular life sciences, 59, 12: 2071–2082
- Shah H.N., Collins M.D. 1983. Genus *Bacteroides*. A chemotaxonomical perspective. The Journal of applied bacteriology, 55, 3: 403–416
- Shoemaker N.B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A.A. 2001. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Applied and environmental microbiology, 67, 2: 561-568
- Simjee S., Heffron A.-L., Pridmore A., Shryock T.R. 2012. Reversible monensin adaptation in *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Clostridium perfringens* of cattle origin: potential impact on human food safety. Journal of antimicrobial chemotherapy, 67, 10: 2388–2395
- Smith C.K.2nd, Stout R.G. 1980. The influence of the fatty acid composition of *Acholeplasma laidlawii* membranes on the growth inhibitory activity of narasin, a polyether ionophorous antibiotic. Biochimica et biophysica acta: biomembranes, 600, 2: 585-589
- Stevenson D.M., Weimer P.J. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. Applied microbiology and biotechnology, 75, 1: 165–174
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular biology and evolution, 24, 8: 1596–1599
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.-P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L.E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environmental microbiology, 11, 10: 2574–2584
- Tepšič K. 2002. Opis genetske pestrosti in sledenje bakterij iz rodov *Prevotella* in *Bacteroides* v prebavilu goveda z molekularnimi metodami. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 149 str.
- The human microbiome project. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 486, 7402: 207–214
- Thorvaldsdóttir H., Robinson J.T., Mesirov J.P. 2013. Integrative genomics viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. Briefings in bioinformatics, 14, 2: 178–192
- Treangen T.J., Rocha E.P.C. 2011. Horizontal transfer, not duplication, drives the expansion of protein families in prokaryotes. PLoS genetics, 7, 1: 1–12

- Tribble G.D., Garza J.J., Yeung V.L., Rigney T.W., Dao D.-H. V, Rodrigues P.H., Walker C.B., Smith C.J. 2010. Genetic analysis of mobile tetQ elements in oral *Prevotella* species. *Anaerobe*, 16, 6: 604–609
- Uredba Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali (Besedilo velja za EGP). Ur. 1. EU št. 268-32003R1831/03
- Wang Y., Wang G.-R., Shelby A. 2003. A newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnGERM1, contains genes also found in gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 69, 8: 4595–4603
- Whittle G., Hund B.D., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 2001. Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Applied and environmental microbiology*, 67, 8: 3488
- Whittle G., Salyers A.A. 2002. Bacterial transposons—an increasingly diverse group of elements. V: Modern microbial genetics. Streips U.N., Yasbin R.N (eds.). New York, Wiley-Liss, Inc.: 415-418
- Whittle G., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cellular and molecular life sciences*, 59, 12: 2044–2054
- Wood J., Scott K.P., Avguštin G., Newbold C.J., Flint H.J. 1998. Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Applied and environmental microbiology*, 64, 10: 3683–3689
- Xu J., Mahowald M.A., Ley R.E., Lozupone C.A., Hamady M., Martens E.C., Henrissat B., Coutinho P.M., Minx P., Latreille P., Cordum H., Van Brunt A., Kim K., Fulton R.S., Fulton L.A., Clifton S.W., Wilson R.K., Knight R.D., Gordon J.I. 2007. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS biology*, 5, 7: 1574–1586
- Zakon o spremembah in dopolnitvi zakona o krmi. Ur.l. RS št. 45-2130/04
- Zoetendal E.G., Vaughan E.E., de Vos W.M. 2006. A microbial world within us. *Molecular microbiology*, 59, 6: 1639–1650

ZAHVALA

Mentorju Gorazdu Avguštinu in Tomažu Accettu se zahvaljujem za usmerjanje in nasvete pri strokovnem delu.

Juretu Škrabanu z Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor se zahvaljujem za pomoč pri pripravi vzorcev in analizi DMK.

Roku Kostanjšku z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete se zahvaljujem za pomoč pri pripravi vzorcev in mikroskopiranju s presevnim elektronskim mikroskopom.

Marcusu Fritzu iz EMBL iz Heidelberga se zahvaljujem za pomoč pri bioinformacijski analizi genomskeh sekvenc.

Lijani in Marti se zahvaljujem za analizo fermentacijskih produktov.

Vsem sodelavcem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo z Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete se zahvaljujem za pomoč, prijetno druženje in zanimive razprave ob kavi.