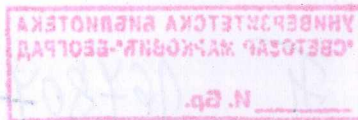


PA 21452



UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

LIDIJA ĐOKIĆ

**METAGENOMSKI PRISTUP ANALIZI MIKROBIOLOŠKOG  
DIVERZITETA RIZOSFERA ENDEMORELIKTNIH BILJAKA I  
IZOLACIJA BAKTERIJA KOJE RAZGRAĐUJU FENOL**



DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2010.

MENTORI:

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik  
Institut za molekularnu genetiku i  
genetičko inženjerstvo, Beograd

dr Svetlana Radović, redovni profesor  
Biološki fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Branka Vasiljević, naučni savetnik  
Institut za molekularnu genetiku i  
genetičko inženjerstvo, Beograd

dr Svetlana Radović, redovni profesor  
Biološki fakultet, Beograd

dr Branka Stevanović, redovni profesor  
Biološki fakultet, Beograd

dr Ivana Morić, naučni saradnik  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko  
inženjerstvo, Beograd

DATUM ODBRANE:



*Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za molekularnu genetiku aktinomiceta, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Ovom prilikom želim da se zahvalim:*

*dr Branki Vasiljević na ukazanom poverenju, strpljenju i velikoj slobodi tokom mog rada, podršci u mnogobrojnim idejama kao i brojnim korisnim diskusijama i savetima koji su doprineli izradi ove teze;*

*dr Ivani Morić na svim korisnim savetima, pomoći i izuzetno korisnim sugestijama tokom pisanju ove teze;*

*dr Branki Stevanović na uzorcima zemljišta i kritičkoj oceni teze;*

*dr Svetlani Radović na kritičkoj oceni teze;*

*dr Miloju Saviću na podršci iz daljine i pomoći pri svim eksperimentalnim stranputicama, kao i na oceni teze;*

*Sandri, Tanji, Nadi i Saši za prijateljsku atmosferu u laboratoriji, za razgovore i savete;*

*Sanjici i Tanjici za svu pomoć u eksperimentalnom radu, za sve radosne i one malo manje radosne trenutke koje smo podelile, kao i na svakom pokušaju da me razvesele;*

*Mami...na svemu.*

## APSTRAKT

Fenol i njegovi derivati, kao najčešći zagađivači prirodne sredine, javljaju se kao prirodni proizvodi i proizvodi ljudskih aktivnosti. Glavni proizvođači fenolnih jedinjenja su rafinerije nafte i fenolna industrija. Oni se javlja i pri razgradnji organskog materijala. Takođe, više biljke sintetišu fenolna jedinjenja, koja potom izlučuju u zemljište. Fenolna jedinjenja se iz prirodne sredine mogu ukloniti fizičkim, hemijskim i biološkim tehnikama (biološki oporavak). Najefikasniji, sa ekonomskog i ekološkog aspekta, je biološki oporavak.

Rizosfere endemoreliktnih biljaka *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* se odlikuju povećanom koncentracijom fenola. Fenol selekcijom mikroorganizama koji mogu da ga tolerišu ili razgrađuju oblikuje mikrobiološke zajednice. U ovom radu analizirane su mikrobiološke zajednice rizosfera, a izolovane su i bakterije koje razgrađuju fenol. Mikrobiološke zajednice su proučavane metagenomskim pristupom i FISH-om. Geni za 16S rRNK umnoženi su iz metagenomskih DNK izolovanih iz zemljišta upotrebom univerzalnih bakterijskih prejmara. Dve konstruisane sredinske biblioteke 16S rRNK genskih klonova, analizirane su restrikcionom analizom (RFLP). Od ukupno 192 klonova, 35 različitih RFLP tipova definisano je iz rizosfere *R. nathaliae*, a 13 iz rizosfere *R. serbica* od ukupno 80 klonova. Reprezentativni klonovi su sekvencirani. Najveći broj sekvenci je pokazao veoma malu sličnost sa kultivisanim bakterijama. FISH analiza je pokazala da je samo 5% bakterija u uzorku aktivno. Takođe, iz rizosfera su izolovane 4 bakterije koje imaju sposobnost razgradnje fenola. Filogenetska analiza sekvenci 16S rRNK gena, pokazala je da su sojevi PS1 i PS12 najrodniji sojevima roda *Bacillus*, a sojevi PS12 i PN1 najrodniji sojevima roda *Streptomyces*. Analizirani su i enzimi (fenol hidroksilaza, katehol 1,2-dioksigenaza i katehol 2,3-dioksigenaza) uključeni u razgradnju fenola. Testirani enzimi su pokazali izuzetno visoku kako ekstraćelijsku tako i intraćelijsku aktivnost. Sva četiri analizirana soja razgrađuju fenol u *orto* putu, dok sojevi PS11 i PN1 fenol razgrađuju i u *meta* putu. Fenol hidroksilaza iz svih analiziranih sojeva je pokazala veliku supstratnu specifičnost, sa Michaelis-ovom konstantom od 51 do 56 nM, i maksimalnom brzinom reakcije od 0,018 do 0,022 U/min. Kako postoji mali broj podataka o bacilusima i streptomicetama koje razgrađuju fenol, ovo istraživanje pruža podatke za bolje razumevanje rasprostranjenosti puteva razgradnje fenola među bakterijskim vrstama, a predstavlja i osnovu za primenu ovih bakterija u biološkom oporavku.

**Ključne reči:** metagenomika, FISH, endemoreliktna biljka, bakterije koje razgrađuju fenol, fenol hidroksilaza, katehol 1,2-dioksigenaza, katehol 2,3-dioksigenaza.

## ABSTRACT

Among many environmental pollutants, phenol and its derivatives emerge as a result of human activities as well as they naturally occur. Oil refineries and phenolic resin industries are major producers of phenolics. On the other hand, organic matter decomposition products contain phenol. Furthermore, higher plants synthesize phenolics and release them into the soil. Removal of phenolic compounds from the environment employs different methods, such as physical, chemical and biological techniques (bioremediation). Bioremediation approach appears to be the most efficient regarding economical and environmental aspects.

Rhizospheres of endemorelict plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae* are characterised by unusually elevated phenol concentration, which acts as selective pressure, shaping indigenous microbial communities by selecting those capable to tolerate or degrade it. In this work microbial communities were analysed in these rhizospheres and also bacteria capable to degrade phenol were isolated. Microbial communities were analysed using metagenomic approach and FISH analysis. The 16S rRNA genes were amplified directly from metagenomic DNAs isolated from soils by universal *Bacteria*-specific rRNA gene primers. Two constructed environmental 16S rRNA gene libraries were screened by RFLP. Among 192 clones, 35 unique RFLP types were determined from rhizosphere of *R. nathaliae*, and 13 from library of *R. serbica* out of total 80 clones. Representative clones were sequenced. Majority of sequences from soil showed very low similarity to any cultured *Bacteria*. FISH experiments showed that the active bacteria represent only a small fraction, approximately 5% of total soil bacteria obtained by DAPI staining. Also, four bacterial strains able to degrade phenol, were isolated. Phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequencing, placed strains PS1 and PS11 in the genus *Bacillus*, while PS12 and PN1 belong to the genus *Streptomyces*. Key enzymes involved in pathways of phenol catabolism, phenol hydroxylase, catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase, were analysed. Tested enzymes showed extremely high intracellular as well as extracellular activities. All four strains used *ortho* degradation pathway, while PS11 and PN1 strains used *meta* pathway in addition. Phenol hydroxylases from all analysed strains showed high substrate affinity with Michaelis constant values in the range from 51 to 56 nM and maximal velocity between 0.018 and 0.022 U/min. Since data on bacillus and streptomycetes phenol degrading strains are scant present study provides better understanding of distribution of phenol degradation pathways across the bacterial species and supplies the basis for possible application of these common soil strains in phenol bioremediation.

**Key words:** metagenomics, FISH, endemorelict plants, phenol degrading bacteria, phenol hydroxylase, catechol 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase.

SADRŽAJ

<b>I UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Proučavanje mikrobiološkog diverziteta.....	2
1.1.1. Monogeniski pristup u analizi mikrobiološkog diverziteta.....	5
1.1.2. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH).....	9
1.2. Klasifikacija bakterija.....	12
1.2.1. Hemotaksonomija.....	13
1.2.2. Numerička taksonomija.....	14
1.2.3. Klasifikacija analizom sekvence 16S rRNK gena.....	15
1.2.4. Polifazni pristup u taksonomiji mikroorganizama.....	18
1.3. Biljke i mikrobiološke zajednice.....	18
1.3.1. Rizosfera.....	20
2. Ramonde – biljke uskrsnice.....	22
3. Fenolna jedinjenja u prirodnoj sredini i njihovo uklanjanje.....	24
3.1. Biološka razgradnja fenola.....	26
3.1.1. Putevi biološke razgradnje fenola.....	28
<b>II CILJ RADA</b> .....	<b>35</b>
<b>III MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>36</b>
3.1. Uzorci zemljišta.....	36
3.2. Bakterijski sojevi i plazmidi.....	36
3.3. Podloge za gajenje mikroorganizama.....	39
3.3.1. Podloge za gajenje <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	39
3.3.2. Hranljive bakterijske podloge.....	39
3.3.3. Minimalna bakterijska podloga.....	40
3.3.4. Diferencijalne podloge za gajenje bakterija iz roda <i>Streptomyces</i> .....	40



3.3.5 Podloge za gajenje kvasaca.....	42
3.4. Određivanje broja bakterija u uzorku.....	42
3.5. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (eng. Fluorescent <i>In situ</i> Hybridization, FISH).....	43
3.5.1. Fiksiranje i ispiranje uzoraka.....	43
3.5.2. Bojenje uzoraka 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI).....	43
3.5.3. FISH.....	44
3.6. Izolacija bakterija iz zemljišta pretretiranog fenolom.....	44
3.7. Bakterije koje razgrađuju fenol.....	45
3.7.1. Optimalni uslovi za rast bakterija na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika.....	45
3.7.2. Stopa rasta i profil razgradnje fenola.....	45
3.8. Izolovanje ukupne DNK iz bakterijskih sojeva.....	46
3.9. Izolovanje ukupne (metagenomske) DNK iz zemljišta.....	47
3.10. Agarozna gel elektroforeza.....	48
3.11. Prečišćavanje DNK fenolom.....	49
3.12. Elektroelucija.....	49
3.13. Obrada DNK restrikcionim endonukleazama.....	50
3.13.1. ARDRA/RFLP analiza (eng. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/Restriction Fragment Length Polymorphism).....	50
3.14. Liganje DNK fragmenata.....	50
3.15. Priprema i transformacija kompetentnih <i>E. coli</i> ćelija.....	51
3.16. Prajmeri korišćeni u ovom radu.....	52
3.17. Sinteza DNK u reakciji lančane polimerizacije.....	54
3.18. Metoda izolacije plazmidne DNK iz <i>E. coli</i> .....	56
3.19. Određivanje biohemijskih i fizioloških osobina izolovanih sojeva.....	57
3.19.1. Lecitinaza test.....	57

3.19.2. Lipaza test.....	57
3.19.3. Redukcija nitrata.....	58
3.19.4. Dokazivanje vodonik sulfida ( $H_2S$ ).....	58
3.19.5. Ispitivanje rasta u prisustvu natrijum azida, talijum acetata ili kalijum telurita.....	59
3.19.6. Ispitivanje razgradnje fenilalanina.....	59
3.19.7. Ispitivanje sposobnosti korišćenja različitih šećera.....	60
3.19.8. Ispitivanje korišćenja različitih izvora azota.....	60
3.19.9. Rast na različitim koncentracijama NaCl.....	61
3.19.10. Ispitivanje hidrolize eskulina.....	61
3.19.11. Ispitivanje korišćenja citrata.....	61
3.19.12. Ispitivanje hidrolize želatina.....	62
3.19.13. Ispitivanje prisustva katalaze.....	62
3.19.14. Ispitivanje hidrolize uree.....	63
3.19.15. Ispitivanje produkcije indola.....	63
3.19.16. Ispitivanje prisustva DNaze.....	64
3.19.17. Detekcija hemolizina.....	64
3.19.18. Ispitivanje rasta na Sabouraud dekstroznom agru.....	65
3.19.19. CAMP (Christie, Atkins and Muench-Petersen) fenomen na <i>Staphylococcus aureus</i> .....	65
3.19.20. Ispitivanje osetljivosti na različite antibiotike „gradient-plate” metodom.....	66
3.19.21. Bojenje bakterija.....	66
3.19.21.1 Bojenje po Gram-u.....	66
3.19.21.2. Bojenje po Ziehl–Neelsen-u.....	67
3.20. Određivanje GC sastava.....	68

3.21. Određivanje izomera diaminopimelinske kiseline (DAP) u ćelijskom zidu bakterije metodom tankoslojne hromatografije ( <i>eng.</i> Tin Layer Chromatography, TLC).....	69
3.22. Pripremanje <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ i bakterija roda <i>Bacillus</i> za dugoročno čuvanje.....	70
3.23. Pripremanje streptomiceta za dugoročno čuvanje.....	70
3.24. Sekvenciranje.....	70
3.25. Bioinformatička obrada sekvenci.....	72
3.26. Pripremanje ćelijskog lizata.....	73
3.27. Enzimski eseji.....	74
3.28. Određivanje temperaturnog i pH optimuma enzima.....	75
3.29. Određivanje Michaelis-ove konstante i brzine enzimske reakcije.....	75
3.30. Određivanje koncentracije proteina.....	76
<b>IV REZULTATI.....</b>	<b>77</b>
4.1. Metagenomski pristup analizi bakterijskog diverziteta.....	77
4.1.1. Izolacija metagenomske DNK iz zemljišta.....	77
4.1.2. Umnožavanje gena za 16S ribozomalnu RNK iz metagenomske DNK.....	78
4.1.3. Konstrukcija 16S rDNK biblioteka sredinskih klonova iz rizosfera <i>R. serbica</i> i <i>R. nathaliae</i> .....	79
4.1.4. ARDRA/RFLP analiza biblioteka sredinskih 16S rDNK klonova.....	80
4.1.5. Sekvenciranje i analiza sekvenci sredinskih klonova.....	82
4.2. DAPI bojenje i fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (FISH).....	85
4.3. Izolacija bakterija sa sposobnošću razgradnje fenola.....	86
4.3.1. Stopa rasta i profil razgradnje fenola.....	89
4.4. Karakterizacija sojeva koji razgrađuju fenol.....	91
4.4.1. Karakterizacija sojeva koji razgrađuju fenol na osnovu 16S rDNK sekvence i određivanje filogenetskih odnosa.....	91

4.4.2. Biohemijske i fiziološke osobine sojeva koji razgrađuju fenol.....	94
4.5. Dodatne analize sa soj PN1.....	96
4.5.1. Tačka topljenja DNK i GC sastav.....	96
4.5.2. Tankoslojna hromatografija (eng. <i>Tin Layer Chromatography, TLC</i> ).....	97
4.6. Enzimi koji učestvuju u razgradnji fenola kod sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1.....	97
4.6.1. Putevi razgradnje fenola i optimalni uslovi za rad enzima koji učestvuju u putevima razgradnje.....	97
4.6.2. Kinetika enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola.....	103
4.6.3. Kinetički parametri enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola.....	106
4.6.4. Molekularno-genetička analiza puteva razgradnje fenola.....	107
<b>V DISKUSIJA.....</b>	<b>109</b>
5.1. Metagenomski pristup analizi mikrobiološkog diverziteta rizosfera <i>Ramonda serbica</i> i <i>Ramonda nathaliae</i> .....	109
5.2. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija.....	121
5.3. Izolacija i karakterizacija bakterija koje razgrađuju fenol.....	122
<b>VI ZAKLJUČCI.....</b>	<b>132</b>
<b>VII LITERATURA.....</b>	<b>137</b>



## I UVOD

Mikroorganizmi, koji su se pojavili pre oko 3 - 4 milijarde godina, bili su prvi oblik života na planeti Zemlji (Cavalier-Smith, 2006). Nakon 3 milijarde godina evolucije mikroorganizama pojavio se i prvi višćelijski organizam (Stanley, 1973). Ovako dugačka evolucija mikroorganizama uslovala je i da oni budu najbrojnija i najrasprostranjenija grupa organizama, čineći oko 60% biomase Zemlje. Procenjeno je da u zemljištima ima oko  $4 - 5 \times 10^{30}$ , a u okeanima  $3,6 \times 10^{29}$  mikroorganizama (Green i Bohannan, 2006; Sogin *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009).

Mikroorganizmi su odgovorni za vitalne biogeohemijske cikluse bez kojih život ne bi ni bio moguć. Kako bi se razumela evolucija i održivost života na Zemlji neophodno je shvatiti strukturu, diverzitet i funkciju mikrobioloških zajednica (Curtis i Sloan, 2005; Dinsdale *et al.*, 2008). Mikroorganizmi su izvor različitih enzima i drugih proizvoda koji imaju primenu u svim glavnim industrijskim granama, a imaju i sposobnost biološke razgradnje otrovnih jedinjenja.

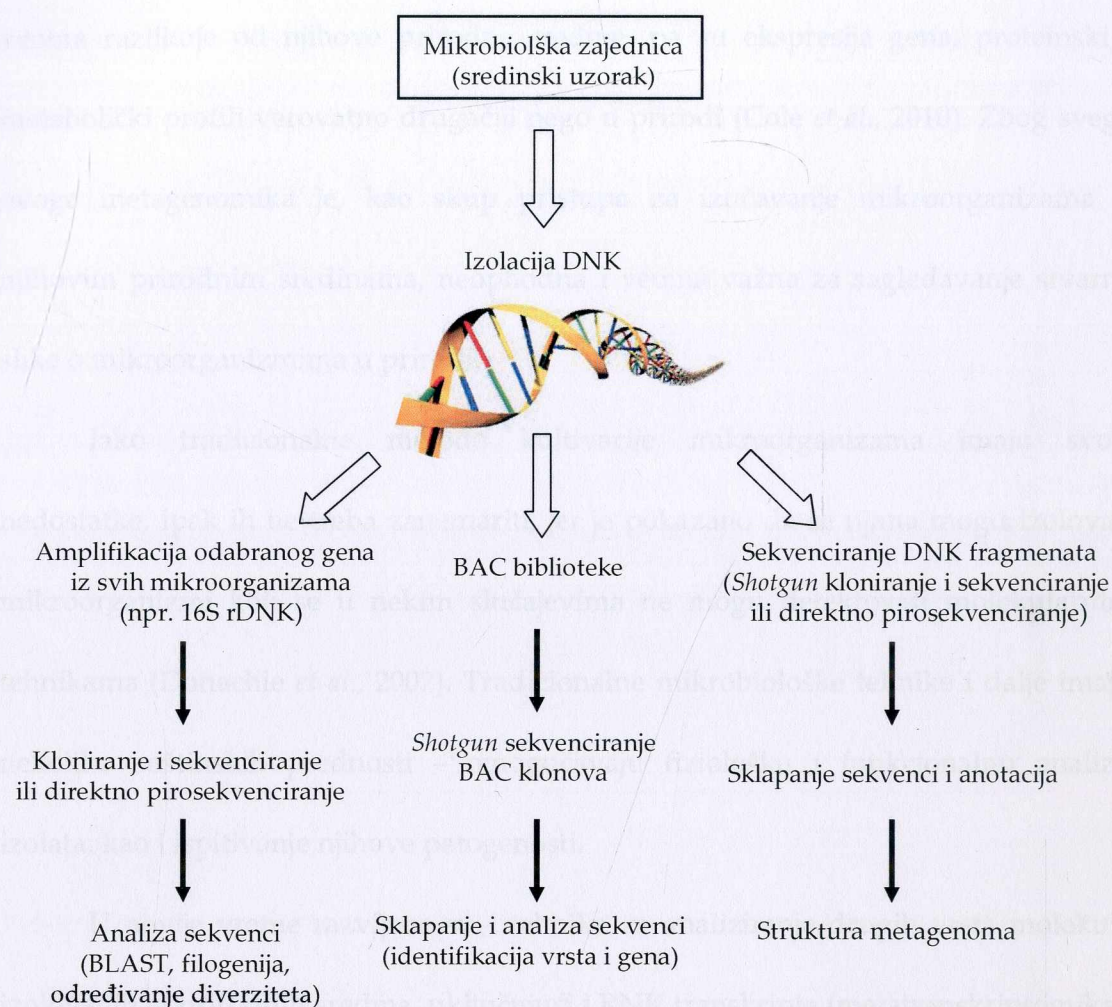


### 1.1. Proučavanje mikrobiološkog diverziteta

Do nedavno, glavni izvor informacija o mikroorganizmima u prirodnoj sredini bila je njihova kultivacija, tj. tradicionalni ili konvencionalni pristup. Ovaj pristup zasniva se na gajenju odabranih mikroorganizmama sa ciljem da se isti identifikuju i/ili proučavaju njihove osobine. Danas se u izučavanju mikroorganizama i njihovog diverziteta koriste moderne molekularno-genetičke tehnike koje se zasnivaju na analizi genetičkog materijala dobijenog direktno iz prirodne sredine. Ovakve pristupe u analizi mikrobioloških zajednica Handelsman je 1998. godine imenovao metagenomika (Handelsman *et al.*, 1998).

Metagenomika podrazumeva bilo koje istraživanje bioloških zajednica u prirodnoj sredini u kome se koriste moderne tehnike genomike, bez potrebe za izolacijom i kultivacijom pojedinačnih organizama (Slika 1.1.). Ovakav pristup omogućio je proučavanje i onih mikroorganizama koje u današnjim laboratorijskim uslovima nije moguće gajiti u kulturi.





Slika 1.1. Tehnike metagenomike koje se koriste pri analizi sredinskih mikrobioloških zajednica.

Pristupi nezavisni od izolacije mikroorganizama su veoma važni ako se ima na umu procena da se više od 99% mikroorganizama ne može gajiti u kulturi u današnjim laboratorijskim uslovima (Torsvik *et al.*, 2002). Čak iako je neke mikroorganizme moguće gajiti u kulturi, veštačka sredina koja im je obezbeđena u laboratoriji se

veoma razlikuje od njihove prirodne sredine, pa su ekspresija gena, proteinski i metabolički profili verovatno drugačiji nego u prirodi (Cole *et al.*, 2010). Zbog svega ovoga metagenomika je, kao skup pristupa za izučavanje mikroorganizama u njihovim prirodnim sredinama, neophodna i veoma važna za sagledavanje stvarne slike o mikroorganizmima u prirodi.

Iako tradicionalne metode kultivacije mikroorganizama imaju svoje nedostatke, ipak ih ne treba zanemariti, jer je pokazano da se njima mogu izolovati mikroorganizmi koji se u nekim slučajevima ne mogu detektovati molekularnim tehnikama (Donachie *et al.*, 2007). Tradicionalne mikrobiološke tehnike i dalje imaju nekoliko suštinskih prednosti – omogućavaju fiziološku i funkcionalnu analizu izolata, kao i ispitivanje njihove patogenosti.

U novije vreme razvijene su i tehnike za analiziranje drugih vrsta molekula izolovanih iz prirodnih sredina, uključujući i RNK transkripte (metatranskriptomika), proteine (metaproteomika) i metabolite (metametabolomika).

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) se takođe koristi u analizi mikrobiološkog diverziteta. Iako predstavlja metodu nezavisnu od izolacije mikroorganizama ne spada u tehnike metagenomike, jer se ne zasniva na izolaciji totalne DNK iz uzorka. U FISH analizama koriste se fluorescentno obeležene probe za detekciju 16S rRNK u maloj subjedinici ribozoma.



### 1.1.1. Monogeniski pristup u analizi mikrobiološkog diverziteta

Analiza DNK izolovanih direktno iz prirodne sredine počela je mnogo pre nego što je termin metagenomika upotrebljen. U ranijim studijama istraživana je rasprostranjenost i diverzitet bakterija preko specifičnih genskih fragmenata u sredinskim uzorcima (Weisburg *et al.*, 1991). Iz više razloga odabran je gen za rRNK male subjednice ribozoma, jer postoji kod svih ćelijskih organizama, sekundarna i tercijarna struktura su visoko konzervirane, dok je primarna sekvenca stabilna i evoluira relativno konstantnom stopom.

Naše viđenje evolutivnih odnosa na zemlji je potpuno izmenjeno komparativnim analizama sekvenci gena za ribozomalnu RNK (Woese *et al.*, 1990). Woese i saradnici (1990) su identifikovali 12 bakterijskih razdela (*lat.* phylum), a od tada je identifikovano još 30 koji nemaju ni jednog ili imaju veoma malo predstavnika koji su kultivisani (Hugenholtz *et al.*, 1998a; Konstantinidis i Tiedje, 2005). Nova bakterijska filogenija je zajedno sa velikim brojem dostupnih sekvenci rRNK gena i razvijanjem novih molekularnih tehnika, omogućila korišćenje ovih gena kao molekularnih markera u sredinskoj mikrobiologiji.

Prvobitna istraživanja zasnovana na analizama 16S rRNK gena (16S rDNK) pokazala su da su mikrobiološke zajednice daleko kompleksnije nego što se očekivalo, što je povećalo interesovanje za ovu tematiku i dovelo do formiranje novog

polja – metagenomike (National Research Council, 2007). Woese i saradnici su 1992. godine objavili prvu veliku kolekciju sekvenci 16S rRNK gena, koja je sadržala 708 sekvenci koje su predstavljale okosnicu baze podataka koja je danas poznata kao „Ribosomal Database Project“ (RDP; Olsen *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 2009). Trenutno u RDP bazi podataka postoji 670 000 anotiranih sekvenci 16S rRNK gena.

Kada se govori o strukturi mikrobioloških zajednica najčešće se misli na identifikaciju različitih mikroorganizama koji su u njoj prisutni. Tradicionalne mikrobiološke tehnike zahtevaju izolaciju i fenotipsku karakterizaciju mikroorganizama iz čistih kultura. Kako se zna da se najveći broj mikroorganizama ne može kultivisati u današnjim laboratorijskim uslovima, tehnike zasnovane na analizama nukleinskih kiselina su metod izbora u određivanju sastava mikrobioloških zajednica.

Molekularno-gentičke tehnike koje se zasnivaju na analizama nukleinskih kiselina u mnogome zavise od uspešne izolacije DNK iz sredinskih uzoraka (metagenomska DNK). Svaki sredinski uzorak najverovatnije nastanjuje veliki broj organizama: bakterije, arheobakterije, virusi, protozoe, alge, gljive, biljke i životinje. Dodatni problem može da stvori prisustvo jednog istog organizma u dva oblika, kao na primer, metabolički aktivan ili neaktivan oblik bakterija (spore). Različiti tipovi ćelija imaju različitu ćelijsku strukturu koja utiče na efikasnost izolacije DNK. Pokazano je da metagenomski podaci zavise od protokola koji je korišćen za izolaciju

DNK (Rondon *et al.*, 2000). Svaki metod izolacije DNK ima dva ključna koraka: (1) ćelijska liza i (2) prečišćavanje DNK. Liza ćelija može biti enzimska ili mehanička (npr. *eng.* bead beating) ili kombinacija obe metode. „Bead beating“ je najinvazivniji način lize ćelija koji je veoma efikasan za liziranje Gram-pozitivnih bakterija. Međutim, mehanička liza dovodi do oštećenja DNK pa je pri izboru metode za izolaciju DNK neophodno voditi računa o svim mogućim problemima, kako bi se dobile relativno velike količine čiste DNK pogodne za dalje analize (npr. sekvenciranje).

Osnova za filogenetsko definisanje bakterija je umnožavanje gena za 16S rRNK male subjedinice ribozoma (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR). Umnoženi proizvod predstavlja smešu 16S rRNK gena koji su poreklom od različitih mikroorganizama iz uzorka. Razvijena su dva pristupa u analizi bakterijskog diverziteta zasnovana na umnožavanju gena iz izolovane metagenomske DNK: (1) sekvenciranje 16S rRNK gena (jedna od tehnika metagenomike) i (2) identifikacija broja različitih bakterijskih grupa na osnovu profila gena za 16S rRNK (*eng.* fingerprinting).

Sekvenciranju se najčešće pristupa tek posle koraka kloniranja PCR produkta u vektor, tj. konstrukcije sredinskih biblioteka (Prosser *et al.*, 2010). Odabir klonova za sekvenciranje se vrši sečenjem klonova različitim enzimima, i analizom i grupisanjem na osnovu restrikcionih profila (*eng.* Restriction Fragment Length



Polymorphysm/Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA/RFLP) u operativne taksonomske jedinice (OTJ), čiji se predstavnici sekvenciraju. Pirosekvenciranjem na kuglicama (454 sekvenciranje) moguće je direktno sekvencirati PCR produkte bez koraka kloniranja (Edwards *et al.*, 2006). Dobijene sekvence se koriste za identifikaciju mikroorganizama prisutnih u uzorku poređenjem sa dostupnim sekvencama u bazama podataka. Povećavanje broja 16S rDNK sekvenci u bazama podataka u poslednjih par decenija poboljšalo je ovaj pristup.

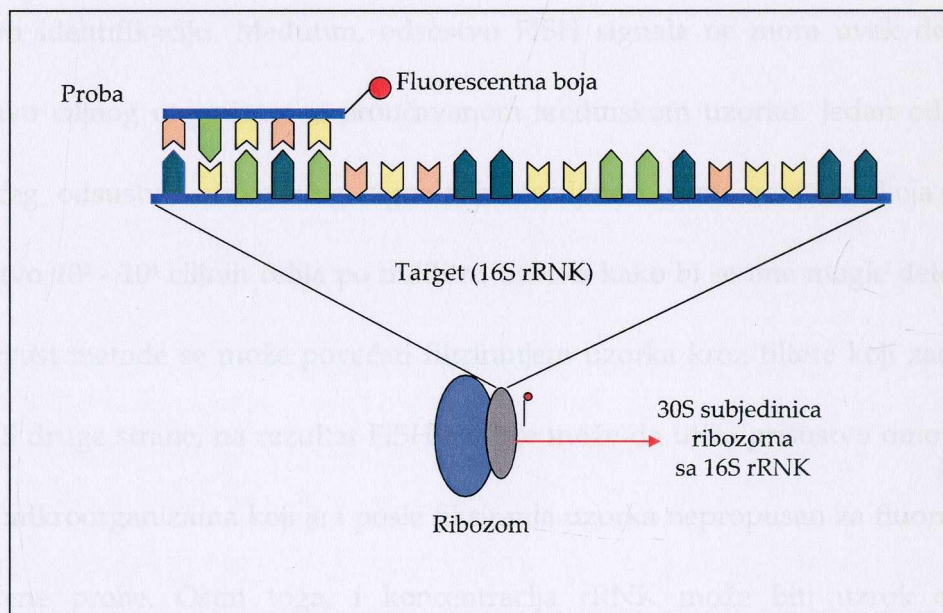
Metode zasnovane na analizi 16S rDNK nezavisne od sekvenciranja, tj. „fingerprinting“ tehnike, zasnivaju se na razvrstavanju 16S rDNK po populacijama koje sačinjavaju datu zajednicu. Jedana od prvih „fingerprinting“ metoda je elektroforeza u denaturišućem gradijentu gela (*eng.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE; Muyzer *et al.*, 1993). Ova metoda se zasniva na analizi heterogenosti u GC sastavu umnoženih fragmenata koja dovodi do razlika u njihovoj sposobnosti denaturacije, a samim tim i kretanja kroz gel. Varijacija ove metode je elektroforeza u temperaturnom gradijentu (*eng.* Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE). Još jedna metoda je i restrikcioni polimorfizam dužine terminalnih fragmenata (*eng.* Terminal Restriction Fragment Length Polymorphysm, T-RFLP), koja se zasniva na razdvajanju PCR produkata na osnovu polimorfizama sekvenci (Liu *et al.*, 1997). Ove tehnike daju predstavu o bogatstvu vrsta u uzorku, ali je identifikacija mikroorganizama moguća samo do nivoa roda.



### 1.1.2. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

Univerzalna prisutnost 16S rRNK u prokariotskim organizmima i postojanje regiona visoke konzerviranosti, kao i regiona visoke varijabilnosti, klasifikovali su 16S rRNK kao dobre markere za proučavanje mikrobioloških zajednica i FISH metodom.

Fluorescentno obeležene probe (Slika 1.2), koje se koriste u FISH metodi za detekciju mikroorganizama prisutnih u uzorku, se dizajniraju na osnovu konzerviranih regiona 16S rRNK molekula i mogu biti specifične za vrstu, rod, familiju ili domen (Amann *et al.*, 1995).



Slika 1.2. Shematski prikaz principa fluorescentne *in situ* hibridizacije sa probama specifičnim za 16S rRNK.

Do danas je objavljen veliki broj oligonukleotidnih proba koje su dostupne u probeBase bazi podataka ([www.microbial-ecology.net](http://www.microbial-ecology.net); Loy *et al.*, 2007). Upotrebom ovih proba i odgovarajućih uslova za hibridizaciju željeni mikroorganizmi se mogu detektovati u sredinskom uzorku fluorescentnim mikroskopom. Razvijeni su i kompjuterski programi namenjeni dizajniranju novih FISH proba za rRNK (Ashelford *et al.*, 2002; Ludwig *et al.*, 2004). Moguće je istovremeno koristiti više od jedne probe za isti organizam, upotrebom više fluorescentnih boja (Amann *et al.*, 1996).

Pozitivni FISH signali (dobijeni od jedne ili više obeleženih proba) u sredinskom uzorku služe za utvrđivanje prisustva mikroorganizma u uzorku kao i za njegovu identifikaciju. Međutim, odsustvo FISH signala ne mora uvek da znači i odsustvo ciljnog organizam u proučavanom sredinskom uzorku. Jedan od razloga mogućeg odsustva očekivanog signala je osetljivost same metode, koja zahteva prisustvo  $10^3$  -  $10^4$  ciljnih ćelija po mililitru uzorka kako bi se one mogle detektovati. Osetljivost metode se može povećati filtriranjem uzorka kroz filtere koji zadržavaju ćelije. S druge strane, na rezultat FISH analize može da utiče prisustvo omotača kod nekih mikroorganizama koji je i posle fiksiranja uzorka nepropusan za fluorescentno obeležene probe. Osim toga, i koncentracija rRNK može biti uzrok odsustva očekivanog signala. Za dobijanje FISH signala sa jednom probom potrebno je više hiljada rRNK molekula tj. ribozoma u ciljnoj ćeliji (Amann *et al.*, 1995). Količina



ribozoma u ćelijama sa malom fiziološkom aktivnošću je znatno ispod praga detekcije. Dodatni problem za dobijanje signala može predstavljati nedostupnost mesta za vezivanje probe usled postojanja sekundarne ili tercijarne strukture u rRNK molekulu i/ili vezanih ribozomalnih proteina (Fuchs *et al.*, 1998; Behrens *et al.*, 2003). Ova prepreka se može zaobići korišćenjem pomoćnih proba koje povećavaju dostupnost obeleženih proba ciljnim sekvencama (Fuchs *et al.*, 2000), ili dizajniranjem proba koje su specifične za lako dostupne regione (Behrens *et al.*, 2003).

FISH metoda kojom se ciljaju 16S rRNK molekuli se koristi i za procenu aktivnosti bakterija u uzorku (Poulsen *et al.*, 1995). FISH signal se najčešće interpretira i kao metabolički aktivna ćelija, a jačina signala predstavlja meru metaboličke aktivnosti, zbog uočene jake veze između sadržaja ribozoma i metaboličke aktivnosti kod bakterija u čistoj kulturi (Schaechter *et al.*, 1958). Međutim, ovo se mora uzeti i sa dozom rezerve, jer više faktora utiče na stabilnost rRNK u bakterijama u prirodnom uzorku (Binder i Liu, 1998; Oda *et al.*, 2000). Naime, neke spororastuće hemolitoautotrofne bakterije zadržavaju relativno visoku količinu rRNK čak i posle dužeg neaktivnog perioda (Morgenroth *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1995).

Velika prednost FISH metode u odnosu na druge tehnike koje se koriste u mikrobiološkoj ekologiji je mogućnost procene zastupljenosti ciljnog organizma. Relativna zastupljenost nekog organizma se najčešće utvrđuje određivanjem odnosa



broja ćelija za koje je vezana specifična proba i ukupanog broja ćelija za koje je vezana univerzalna proba.

FISH tehnika je veoma uspešno upotrebljena za proučavanje mikroorganizama u različitim sredinskim uzorcima (Amann *et al.*, 2001). Ipak, ova tehnika nije pogodna za sve vrste uzoraka. Ukoliko uzorak ima neku abiotičku komponentu ili ćelije koje poseduju veliku urođenu autofluorescencu (npr. cijanobakterije), detekcija zasnovana na fluorescenciji je otežana. Sličan problem predstavljaju i komponente u uzorku za koje oligonukleotidna proba može da se adsorbuje. Ukoliko bakterije rastu u materijalu koji ne propušta svetlost, kao što su čestice zemljišta, FISH analiza je moguća samo ukoliko se uzorak iseče dovoljno tanko ili profiltrira posle hibridizacije.

## 1.2. Klasifikacija bakterija

Klasifikacija je proces pri kome se različiti organizmi svrstavaju na osnovu većeg broja karakteristika u grupe u okviru određene hijerarhijske sheme (Tucić i Cvetković, 2000).

Bakterije su dugo bile svrstavane u grupe samo na osnovu morfoloških karakteristika, što se pokazalo kao nepouzdan način za identifikaciju nepoznatih izolata, kao i za razlikovanje već postojećih. Primena biohemijskih, hemijskih,

genetičkih, numeričkih i molekularno-bioloških tehnika napravila je revoluciju u sistematici bakterija i ukazala na nove trendove u njihovoj identifikaciji i klasifikaciji (Goodfellow i Cross, 1984).

Tri moderne metode klasifikacije koje treba da daju odgovore na pitanja o evolutivnim i filogenetskim odnosima bakterija su: hemotaksonomija, numerička taksonomija i molekularna taksonomija zasnovana na analizi DNK sekvenci. Međutim, sve češće se pri klasifikaciji mikroorganizama, radi dobijanja što boljih i preciznijih rezultata, koristi kombinacija sve tri metode, takozvani polifazni pristup.

### *1.2.1. Hemotaksonomija*

Hemijska sistematika ili hemotaksonomija je disciplina u kojoj se informacije dobijene hemijskom analizom čitavih organizama ili ćelijskih frakcija koriste za klasifikovanje i identifikaciju organizama, kao i za praćenje evolutivnih trendova.

Hemotaksonomija se zasniva na činjenici da su specifična jedinjenja, kao što su amino kiseline, lipidi i šećeri kvalitativno različiti kod različitih organizama. Međutim, važno je i da su uočene varijacije u hemijskoj strukturi rezultat genetičke razlike, a ne nastale zbog varijacija u uslovima gajenja. Zato je neophodno da se kulture gaje pod pažljivo standardizovanim uslovima pre no što se pristupi

hemotaksonomiji. Nekoliko rutinskih tehnika koje se sve više koriste u prokariotskoj taksonomiji zasnivaju se na analizi:

(1) Sastava ćelijskog zida - ova tehnika se najčešće koristi pri klasifikaciji Gram-pozitivnih mikroorganizama. Analizira se tip peptidoglikana kao i teihoična kiselina (Schleifer i Kandler, 1972; Suzuki *et al.*, 1993).

(2) Lipida - osnova klasifikacije je hromatografska analiza sastava i koncentracije masnih kiselina (hidroksilisane, nehidroksilisane, razgranate), polarnih lipida, lipopolisaharida, izoprenoidnih kvinona (Kämpfer, 1998).

(3) Poliamina - ovo su polikatjonska jedinjenja sa važnom ali nepotpuno proučenom ulogom u prokariotskoj ćeliji. Njihov sastav i koncentracija se koriste pri klasifikaciji u taksonomske jedinice višeg ranga od ranga vrste (Busse i Auling, 1988).

### 1.2.2. Numerička taksonomija

Numerička taksonomija se pokazala kao efikasna moderna metoda za utvrđivanje odnosa na nivou vrste i soja bakterija, za razliku od hemotaksonomije kojom se mogu praviti razlike samo do nivoa roda.

Numerička taksonomija zasniva se na konstrukciji velike baze podataka za mnoge vrste i sojeve koje se zatim grupišu na osnovu sličnosti (Goodfellow i Cross, 1984). Polazi se od stava da će klasifikacija biti najinformativnija ako se zasniva na

opštoj sličnosti koja se utvrđuje analizom što većeg broja karakteristika (Tucić i Cvetković, 2000). Inicijalno, sve karakteristike su međusobno jednake, ali kada se počne sa klasifikacijom, karakteristike specifične za određene grupe se mogu odabrati i izdvojiti kako bi se dalje pristupilo konstrukciji dihotomih ključeva, dijagnostičkih tablica, i matrica verovatnoće za identifikaciju izolata (Goodfellow i Cross, 1984). Karakteristike koje se najčešće koriste pri numeričkoj klasifikaciji i identifikaciji bakterija su: oblik spora, šare na površini spora, i druge morfološke karakteristike, ali i fiziološke i biohemijske karakteristike, kao što su rast na različitim temperaturama, antimikrobna aktivnost, enzimska aktivnost, otpornost na antibiotike itd.

Pošto se u sistematici pod karakteristikom podrazumeva bilo koji aspekt organizma koji se analizira, za numeričku taksonomiju nije od posebnog značaja da li se određuje sličnost u morfologiji, ponašanju, fiziologiji, hromozomima ili genima.

### *1.2.3. Klasifikacija analizom sekvence 16S rRNK gena*

U proteklih 30 godina, tehnike koje uključuju analizu 16S rRNK ili gena koji kodiraju 16S rRNK dovele su do revolucije u prokariotskoj taksonomiji. Zaključci izvedeni iz ovih analiza zasnivaju se na pretpostavci da su ovi geni visoko konzervirani zbog fundamentalne uloge ribozoma u sintezi proteina. Svi rRNK molekuli imaju identične ili gotovo identične funkcije – odgovorni su za proces translacije.

Kako je primarna struktura 16S rRNK molekula poznata, identifikovani su konzervirani i varijabilni regioni. Analiza sekvenci je pokazala da postoje sekvence specifične za pojedinačne filogenetske grupe, dok bi se varijabilni regioni mogli iskoristiti za klasifikaciju organizama u taksonomske kategorije niže od roda.

Trodimenzionalna struktura 16S rRNK molekula koja je odgovorna za funkcionalne karakteristike pokazuje vrlo male, ali u nekim slučajevima vrlo značajne varijacije. Međutim, bez obzira na ovu ukupnu konzerviranost celokupne strukture, molekularna sekvenca u mnogim regionima 16S rRNK molekula kontinuirano evoluira, pri čemu promene primarne strukture ne utiču na sekundarnu i tercijarnu strukturu te funkcija molekula nikada nije narušena.

Iako je ukupna struktura rRNK vrlo slična kod pripadnika tri filogenetska domena (*Archaea*, *Bacteria* i *Eucarya*) postoje i karakteristične razlike u strukturi koje su specifične za svaki domen (Gutell *et al.*, 1994). Zahvaljujući saznanjima o visokoj konzerviranosti rRNK molekula došlo se do koncepta koji bi tu konzerviranost trebalo da iskoristi za sistematiku organizama.

Najdirektniji i najbrži pristup izučavanju polimorfizma unutar lokusa za 16S rRNK je PCR amplifikacija ovog regiona. Polimorfizam PCR produkata se dalje može proučavati restrikcijom analizom i/ili sekvenciranjem. Međutim, korišćenje ovih gena u klasifikaciji/identifikaciji mikroorganizama ima i svoje nedostatke. Kao prvo, gen za 16S rRNK je samo jedan gen, iako je najkonzerviraniji po pitanju sekvence.



Moguća je veoma velika fenotipska različitost među organizmima koji imaju iste 16S rRNK gene, kao što je to pokazano za prirodne populacije roda *Vibrio* (Hunt *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2005). Potrebno je u potpunosti razumeti kako odnosi formirani na osnovu jednog gena odslikavaju udaljenost na nivou celih genoma tj. organizama. Takođe je veoma bitno odrediti i koliko je čest horizontalni transfer rRNK operona, kao i stepen različitosti sekvenci i učestalost rekombinacije između više rRNK operona unutar istog genoma (Cole *et al.*, 2010).

Kako bi se procenila i ocenila filogenija/taksonomija prokariota zasnovana na 16S rRNK genima, razvijeno je nekoliko različitih pristupa. Svi ovi pristupi su zasnovani na korišćenju celih genomskih sekvenci ili odabranih delova genoma (Brown *et al.*, 2001; Ciccarelli *et al.*, 2006; Gophna *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2001). Svaki od njih ima svojih prednosti i mana, a rezultati dobijeni u ovim analizama se veoma malo razlikuju (Delsuc *et al.*, 2005; Gogarten i Townsend, 2005). Glavni zaključak je da je metodologija zasnovana na genima za 16S rRNK dovoljno dobra za procenjivanje srodnosti na nivou roda i viših taksonomskih grupa, dok za niže taksonomske kategorije najčešće nije dovoljna.

#### 1.2.4. Polifazni pristup u taksonomiji mikroorganizama

Klasifikacija mikroorganizama bazirana na tradicionalnim mikrobiološkim metodama (morfološkim, fiziološkim i biohemijskim) ne daje pravu sliku o taksonomskoj pripadnosti. Danas je u bakterijskoj klasifikaciji opšteprihvaćen polifazni pristup. Ovaj pristup predstavlja kombinaciju svih metoda klasifikacije – hemijskih, numeričkih i metoda genetičke analize (npr. sekvenciranje 16S rRNK gena, analiza GC sastava, DNK–DNK hibridizacija; Vandamme *et al.*, 1996). Iako je vremenski veoma zahtevan i često izuzetno skup, ovo je jedini pristup koji daje korektne rezultate u klasifikaciji bakterija do nivoa soja.

#### 1.3. Biljke i mikrobiološke zajednice

Biljke, kako ispod tako i iznad zemljišta, predstavljaju veoma pogodnu sredinu za kolonizaciju mikroorganizmima, kao i za njihov rast. Veliki broj mikroorganizama je naselio biljke specijalizujući se za specifične uslove sredine ili stupajući u komensalne, mutualističke ili parazitske odnose.

U okviru pojedinačne biljke izdvaja se nekoliko specifičnih niša, koje se mogu svrstati u tri različite grupe: (1) filosfera, (2) endosfera i (3) rizosfera.

(1) Površina listova ili filiosfera, predstavlja najveću dodirnu površinu biosfere i atmosfere na Zemlji ( $10^9 \text{ km}^2$ ) koja, sa procenjenim totalnim brojem bakterija od  $10^{26}$ , predstavlja značajan rezervoar bakterijskih populacija. Filiosfera je veoma heterogena po pitanju topografije, zaštite od stresa i dostupnosti nutrijenata. Najvažniji stresovi specifični za ovu nišu su desikacija, UV zračenje i slaba dostupnost nutrijenata.

(2) Endosfera predstavlja unutrašnjost same biljke. Ova sredina je relativno bogata hranljivim materijama i vodom, ali je osmotski stres veoma visok, a dostupnost kiseonika mala. Endosferu čini veliki broj različitih sredina, jer svako biljno tkivo nudi različite uslove.

(3) Rizosfera je Hiltnerova (1904) kovanica koja definiše površinu korena (*eng.* rhizoplane) i zonu oko korena u kojoj biljke ispoljavaju svoj uticaj. Rizosfera je i mesto interakcija biljaka i mikroorganizama. Biljni eksudati su najveći izvor ugljenika u ovoj prirodnoj sredini. Takođe, biljke izlučuju i jedinjenja koja deluju selektivno na pojedine grupe mikroorganizama, pa je samim tim i diverzitet mikroorganizama manji ili kvalitativno različit od diverziteta u okolnom zemljištu (Kowalchuk *et al.*, 2002). Najčešći faktori stresa u ovoj sredini su inhibitorne supstance koje izlučuje sama biljka kao i velika kompeticija za hranljive materije.

Rizosfera, filiosfera i endosfera se veoma razlikuju po uslovima koji u njima vladaju, ali su ipak međusobno povezane i mikroorganizmi iz jedne niše mogu indirektno uticati na pojedine mikroorganizme ili zajednicu iz druge, tako što

indukuju sistemski odgovor biljke (Kowalchuk *et al.*, 2010). Biljke mikroorganizmima pružaju hranljive materije, kao i raznolike fizičke strukture kao podlogu za rast ili za zaštitu. Međutim, lokalni uslovi kao što su dostupnost vode, temperatura, sunčevo zračenje, različiti mehanizmi zaštite kod biljaka, kao i različiti faktori stresa, direktno utiču na rast mikroorganizama. Svi ovi pozitivni i negativni faktori stvaraju selektivni pritisak koji oblikuje mikrobiološke zajednice vezane za biljku.

### 1.3.1. Rizosfera

Rizosfera predstavlja zonu zemljišta koja okružuje površinu korena u kojoj biljka izlučuje svoje produkte (Hiltner, 1904). Ovo zemljište se po sastavu razlikuje od okolnog zemljišta po pH vrednosti, redoks potencijalu, koncentraciji nutrijenata i vode i prisustvu različitih izlučevina (Marschner, 1995).

Biljke kroz korenov sistem izlučuju različita jedinjenja koja utiču na nutritivne i hemijske osobine rizosfere. Procenjeno je da 40% proizvoda fotosintetske aktivnosti može završiti u rizosferi procesima kao što su eksudacija, sekrecija i liza ćelija korena, koji se zajedno nazivaju rizodepozicija (Lynch i Whipps, 1990). Priroda rizodepozicije zavisi od same biljke i uslova u kojima raste, a to su najčešće šećeri, amino kiseline, organske kiseline, vitamini i polimeri. Da bi mikroorganizmi mogli da nasele ovakvu sredinu oni moraju da imaju sposobnost kolonizacije, odnosno da poseduju

mehanizme koji im to omogućavaju (Lutenberg *et al.*, 2001), npr. "quorum sensing" (Espinosa-Urgel i Ramos, 2004). Biljne izlučevine pospešuju rast specifičnih mikroorganizama u zajednicama, uslovljavajući povećanje gustine populacije, ali i smanjenje broja vrsta, zbog čega se mikrobiološki diverzitet u rizosferi razlikuje od okolnog zemljišta (Smalla *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002). Samim tim rizosfera je selektivno bogata mikroorganizmima koji su adaptirani na ovakve uslove i koji mogu da iskorišćavaju specifične organske komponente koje izlučuje biljka (Berg *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2005; el Zahr *et al.*, 2008).

Kompeticijom sa mikroorganizmima za hranljive materije i sam koren utiče na mikrobiološku zajednicu u njegovoj blizini. Jedan od ključnih adaptacionih mehanizama rizosfernih mikroorganizama jeste njihova sposobnost da se efikasno takmiče u borbi za nutrijente. Naime, mikroorganizmi se u ovakvoj sredini takmiče kako sa ostalim mikroorganizmima, tako i sa samom biljkom i njenim simbiontima (Kowalchuk *et al.*, 2010). Druge adaptivne strategije mikroorganizama uključuju sposobnost korišćenja i mnogih štetnih produkata biljaka, kao i sposobnost detoksifikacije ili korišćenja toksičnih jedinjenja, kao što su antibiotici, koje proizvodi biljka ili drugi mikroorganizmi (Kowalchuk *et al.*, 2010).

Promene u prirodnoj sredini uzrokuju promenu fiziologije biljke, što je praćeno brzom promenom sastava mikrobioloških zajednica rizosfere (Bailey, 2004; Rasche *et al.*, 2006; Sessitsch *et al.*, 2002). Pokazano je da u rizosferama

dominantnu bakterijsku grupu čine *α-Proteobacteria*, dok u zemljištu na kome ne rastu biljke preovladavaju *Acidobacteria* (Griffiths *et al.*, 2006). Moglo bi se zaključiti da biljni eksudati u formi rizodepozicija uslovljavaju promene u relativnoj zastupljenosti pojedinih grupa mikroorganizama.

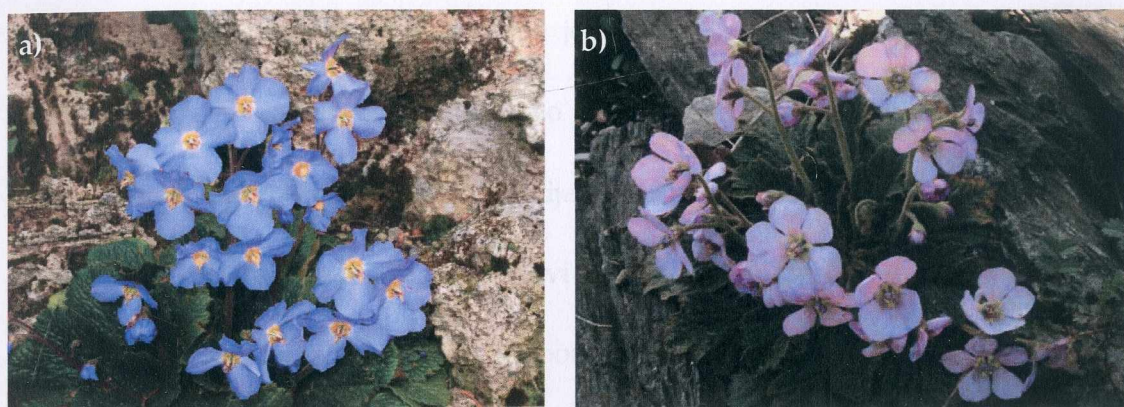
Struktura i aktivnost rizosfernih zajednica u najvećoj meri zavisi od vrste biljaka, pa se može govoriti o takozvanim mikrobiološkim zajednicam specifičnim za biljnu vrstu (Smalla *et al.*, 2001).

## 2. Ramonde – biljke uskrsnice

Biljke cvetnice koje rastu u toplim i suvim regionima najčešće preživljavaju teške uslove u prirodnom staništu aktivirajući adaptivne mehanizme otpornosti na nepovoljne uslove. Veoma mali broj viših biljaka, koje najčešće potiču sa južne hemisfere, ima sposobnost preživljavanja skoro potpune dehidracije tokom dužeg vremenskog perioda. Ove biljke su poznate kao biljke tolerantne na desikaciju ili biljke uskrsnice.

*Ramonda nathaliae* i *Ramonda serbica* (Slika 1.3.) su biljke uskrsnice i endemorelikti Balkanskog poluostrva (Gaff, 1981; Stevanović *et al.*, 1986). Ove vrste su sposobne da preživljavaju duže periode suše u stanju anabioze.





Slika 1.3. Ramonde. a) *Ramonda nathaliae* i b) *Ramonda serbica*.

Iako su tokom anabioze metabolički procesi kod *Ramonda* skoro potpuno zaustavljeni, pokazano je da su u listovima isušenih biljaka očuvane i zaštićene ćelijske membrane i većina enzimskih sistema (Bewley i Krochko, 1982; Oliver, 1996; Navari-Izzo i Rascio, 1999). Opšta karakteristika biljaka izloženih isušivanju je povećanje proizvodnje reaktivnih kiseoničnih vrsta (*eng.* Reactive Oxygen Species, ROS), sve dok dehidracija ne uspori metaboličke aktivnosti, a samim tim i proizvodnju ROS-a (Navari-Izzo *et al.*, 1995; Sgherri *et al.*, 1994). Kako bi se odbranile od ROS-a, koje dovode do drastičnih promena u metabolizmu masti i ugljenih hidrata (Navari-Izzo i Rascio, 1999) i razgradnje hlorofila i proteina, biljke poseduju antioksidanse i protektivne enzime (superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza). U uklanjanju slobodnih radikala učestvuju i polifenolna jedinjenja (Rice-Evans *et al.*, 1996). Povećana koncentracija fenolnih jedinjenja takođe štiti ramonde od oštećenja (Sgherri

*et al.*, 2000). Pretpostavlja se da fenolna jedinjenja, sa askorbatima, potpomažu rad peroksidaze u vakuolama i deluju kao sistem za uklanjanje vodonik peroksida (Sgherri *et al.*, 2003). Fenoli najverovatnije služe kao elektron donori za vakuolarnu peroksidazu. Pretpostavlja se da su svi mehanizmi uključeni u zaštitu ćelijskih membrana, kao i veoma brz i efikasan oporavak i rekonstitucija membrana, najvažniji za preživljavanje biljke nakon rehidracije (Stevanović *et al.*, 1992; Navari-Izzo *et al.*, 1995, Sgherri *et al.*, 2000).

Fenolna jedinjenja koja proizvodi biljka izlučuju se kroz korenov sistem u rizosferu, pa je i količina fenola u zemljištu povećana. Koncentracija fenolnih jedinjenja u rizosferi *R. serbica* je najmanje tri puta veća od koncentracije fenola u rizosferama drugih viših biljaka (Sgherri *et al.*, 2003).

### 3. Fenolna jedinjenja u prirodnoj sredini i njihovo uklanjanje

Fenol i njegovi derivati (fenolna jedinjenja) predstavljaju jednu od najvećih grupa prirodnih proizvoda. Kao takvi, mogu se pre svega naći kod viših biljaka gde imaju različite funkcije. Kako i svi biljni produkti tako i fenol kroz korenov sistem ulazi u rizosferu. Fenol nastaje i pri mikrobiološkoj razgradnji biljnog i životinjskog materijala. On je jedna od supstanci od kojih potiče neprijatan miris pri raspadanju životinjskog otpada (Zahn *et al.*, 2001). Osim toga, fenol se u prirodnoj sredini može



naći i kao rezultat neodgovarajućeg tretiranja otpadnih voda poreklom iz hemijske i farmaceutske industrije, kao i iz rafinerija, što za posledicu ima zagađenje podzemnih voda i zemljišta.

Kako je fenol isparljivo jedinjenje, velike količine fenola završe i u atmosferi. Fenol u vazduhu je najčešće poreklom od izduvnih gasova iz vozila ili nastaje pri sagorevanju drveta, uglja ili spaljivanjem čvrstog otpada. Štetni uticaj fenola na žive organizme je ogroman, te je fenol proglašen zagađivačem visokog prioriteta od strane Američke agencije za zaštitu prirodne sredine (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1998).

Zbog ovako velike zastupljenosti fenolnih jedinjenja u prirodi i njihove velike toksičnosti, od velike je važnosti smanjenje njihove količine. Najbolji pristup je delovanje pre nego što toksična jedinjenja dospeju u prirodnu sredinu, a to se može postići prerađivanjem otpadnih industrijskih voda pre njihovog ispuštanja (Gianfreda *et al.*, 2006). Postoji više metoda za uklanjanje fenolnih jedinjenja iz zagađene sredine. Tradicionalne fizičke i hemijske metode su veoma skupe, a produkti koji u njima nastaju najčešće su još toksičniji od samog fenola i njegovih derivata (Cardoso *et al.*, 2009). Sa druge strane, postoje mikroorganizmi koji poseduju sposobnost biološke razgradnje toksičnih jedinjenja. Pri biološkoj razgradnji organskih zagađivača nastaju voda i ugljen dioksid, dok sami mikroorganizmi uvećavaju svoju biomasu. Zbog

svojih karakteristika mikroorganizmi se sve više koriste pri uklanjanju zagađenja (Devinny, 1998).

Ukoliko fenolna jedinjenja dospeju u prirodnu sredinu, upotreba prirodnog procesa biološke razgradnje je najčešći metod izbora, jer je ekološki i ekonomski najisplativiji (Lynch i Moffat, 2005). Ovakva metoda se naziva biološki oporavak (*eng.* bioremediation).

### 3.1. Biološka razgradnja fenola

Mikroorganizmi u prirodnim staništima su pod konstantnim selektivnim pritiskom. U ovakvim uslovima mnogi su razvili mehanizme koji im omogućavaju bolju kolonizaciju ili preživljavanje u ekstremnim uslovima. U zagađenoj prirodnoj sredini prednost imaju mikroorganizmi koji mogu tolerisati ovakve uslove i/ili oni koji mogu razgraditi zagađivače.

Fenolna jedinjenja kao i drugi aromatični ugljovodonici su široko rasprostranjeni u prirodnoj sredini. U zagađenim staništima najveći broj mikroorganizama koji se mogu kultivisati ima sposobnost biološke razgradnje zagađivača, dok u nezagađenim staništima oni predstavljaju samo 0,1% mikroorganizama koji se mogu kultivisati (Andreoni i Gianfreda, 2007). Glavna promena u bakterijskim zajednicama po zagađenju jeste proliferacija Gram-

negativnih bakterija i proteobakterija, dok Gram-pozitivne bakterije pokazuju manji stepen promene (Margesin *et al.*, 2003).

Bakterije koje poseduju sposobnost razgradnje fenola su izolovane iz različitih staništa – zemljišta (DeRito *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2005), rizosfera i korena biljaka (Wang *et al.*, 2007), nodula (Wei *et al.*, 2008), rečnih (Heinaru *et al.*, 2000) i morskih ekosistema (Shashirekha *et al.*, 1997). Kako je isparljivost fenola velika, u skorije vreme su izolovane i bakterije iz filozofere koje poseduju sposobnost razgradnje fenola (Sandhu *et al.*, 2009).

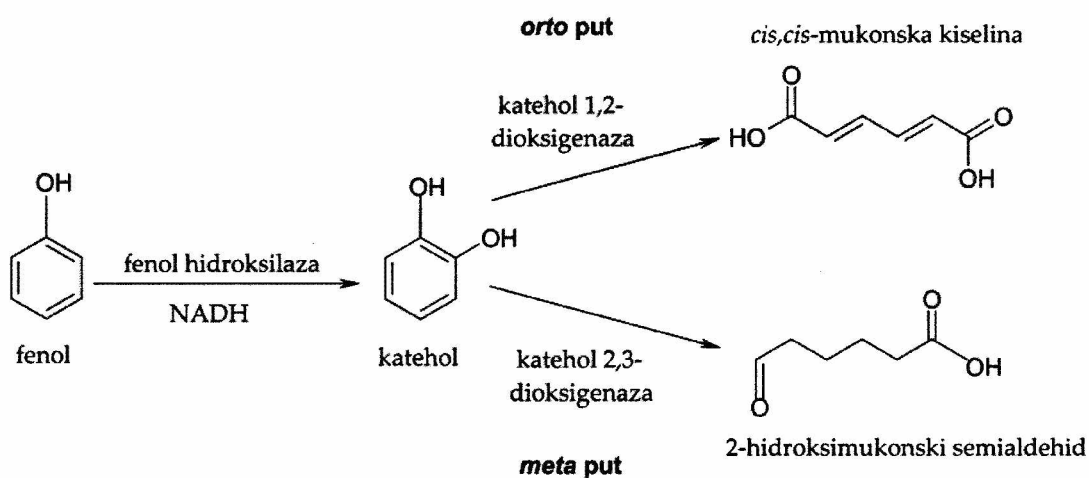
Fenol, kao i drugi zagađivači, ispoljava svoju toksičnost čak i kod organizama koji ga mogu koristiti kao izvor ugljenika, tako što u određenim koncentracijama inhibira njihov rast. *Pseudomonas putida* F1 koji, iako ima sposobnost razgradnje fenola, bolje raste u prisustvu drugih aromatičnih supstrata nego u prisustvu fenola (Reardon *et al.*, 2000). S ciljem da se pronađe organizam koji toleriše i razgrađuje visoke koncentracije fenola, mikroorganizmi su izolovani i iz otpada bogatih fenolima (Rigo i Alegre, 2004; Santos i Linardi, 2004).

Najčešće izolovane i opisivane bakterije koje poseduju sposobnost razgradnje fenola su bakterije roda *Pseudomonas* (Artuchelvan *et al.*, 2005, Kamara *et al.*, 2009; Takeo *et al.*, 2007). Postoje i podaci o bakterijama iz roda *Acinetobacter* (Abd-el-Haleem *et al.*, 2002), *Burkholderia* (El-Sayed *et al.*, 2003), *Valivorax* (Watanabe *et al.*, 1998), mezofilnim i termofilnim metanogenima (Chen *et al.*, 2008), kao i gljivama *Candida*

*tropicalis* (Jiang *et al.*, 2005), *Fusarium sp.* (Cai *et al.*, 2007) i *Trichosporum cutaneum* (Neujahr i Gaal, 1973).

### 3.1.1. Putevi biološke razgradnje fenola

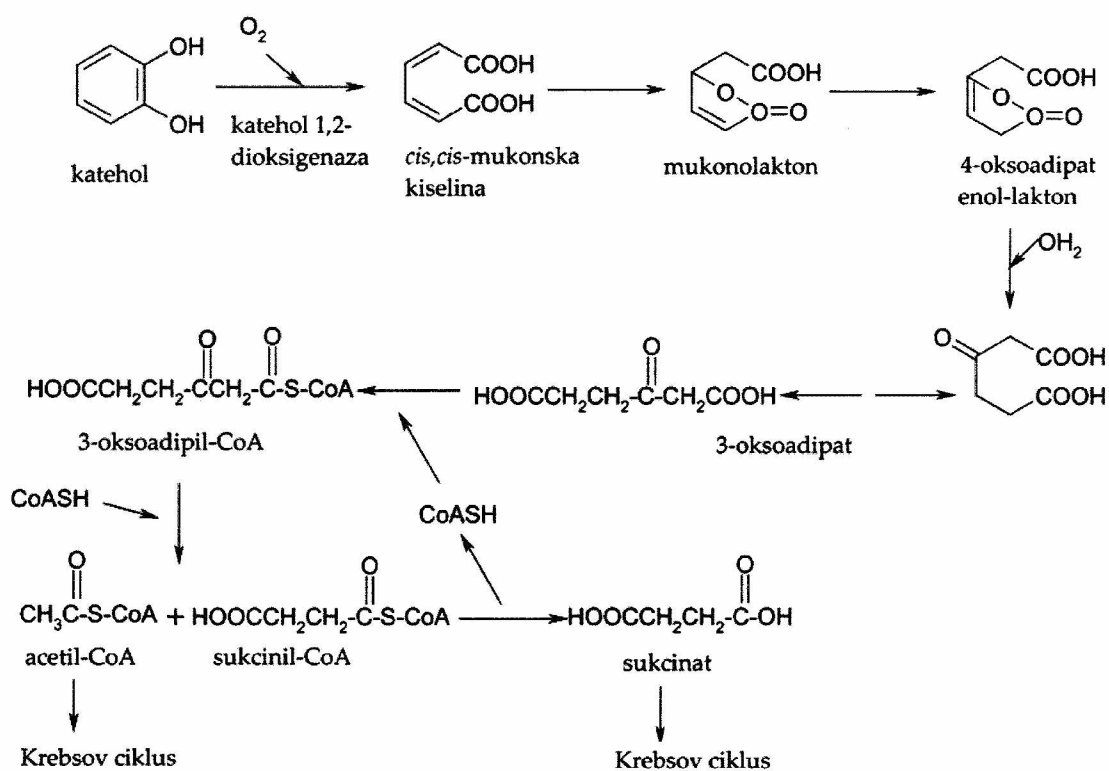
Biološka razgradnja prirodnih i ksenobiotskih fenolnih jedinjenja je intenzivno proučavana, i identifikovano je nekoliko puteva razgradnje (Moiseeva *et al.*, 2002). Fenolna jedinjenja se prvo konvertuju u reaktivnije dihidroksilne intermedijere (fenol u katehol), koji se dalje razgrađuju u *meta* ili *orto* putu (Slika 1.4.).



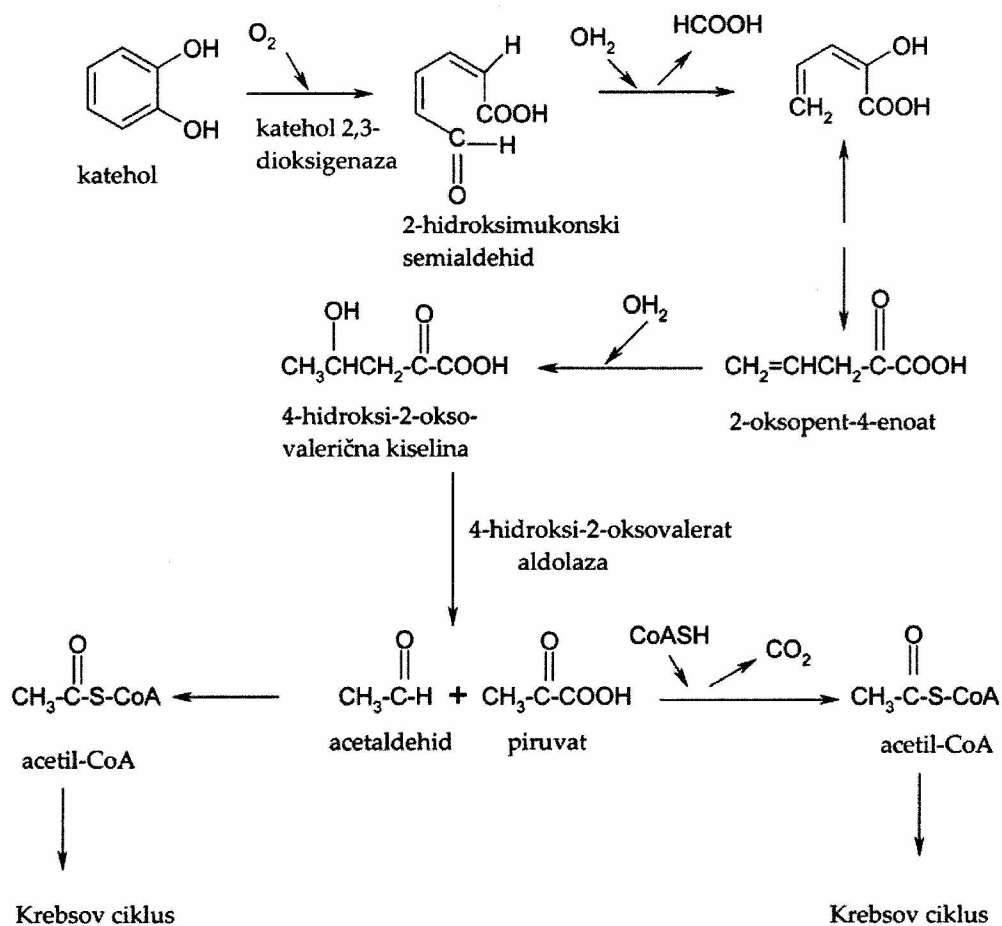
Slika 1.4. Prvi korak u biološkoj razgradnji fenola i početni koraci *orto* i *meta* puta.

Enzim koji prevodi fenol u katehol, u prvom koraku razgradnje fenola, je fenol hidroksilaza (PH). PH je flavoprotein monooksigenaza koja koristi koenzim NADH i O<sub>2</sub> i fenol kao supstrat i sastoji se od jedne komponente (jednokomponentna fenol hidroksilaza; sPH) ili od više njih (multikomponentna fenol hidroksilaza; mPH) (Pessione *et al.*, 1999). Ovaj enzim je specifičan za prokariote, ali je pronađen i kod nekih eukariota, kao što su *Candida tropicalis* (Páca *et al.*, 2007), *Fusarium sp.* (Cai *et al.*, 2007) i *Trichosporum cutaneum* (Neujahr and Gaal, 1973). Otvaranje kateholnog prstena se odvija posredstvom enzima katehol 1,2-dioksigenaze (C12O) u *orto* putu ili posredstvom enzima katehol 2,3-dioksigenaze (C23O) u *meta* putu. U *meta* putu, kao primarni proizvod otvaranja prstena, nastaje 2-hidroksimukonski semialdehid, dok je primarni proizvod *orto* puta *cis,cis*-mukonska kiselina (Dagley *et al.*, 1960; Ornston i Stanier, 1966). Primarni produkti se u drugim koracima enzimskih reakcija konvertuju do jedinjenja koja potom ulaze u Krebsov ciklus (Hendrickx *et al.*, 2006). Finalni proizvodi *orto* puta su sukcinat i acetil koenzim A (acetil-CoA) (Slika 1.5.), dok su acetaldehid i piruvat finalni proizvodi *meta* puta (Slika 1.6.).





Slika 1.5. Orto put razgradnje katehola.

Slika 1.6. *Meta* put razgradnje katehola.

Enzimi C12O ili C23O u metaboličkom putu razgradnje fenola mogu biti u kombinaciji sa sPH ili mPH. Pokazano je da su bakterije koje poseduju mPH dominantne u prirodnim staništima (Peters *et al.*, 1997). Katalitički domen multikomponentne fenol hidroksilaze se nalazi u okviru njene velike subjedinice

(LmPH, L od *eng.* Large) (Hino *et al.*, 1998). U zavisnosti od organizacije operona, mPH se dele na *dmp* tip (kao kod *Pseudomonas sp.* CF 600) ili *mop* tip (kao kod *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB 8250). U *dmp* tipu gen za mPH je povezan sa genima *meta* puta razgradnje (Shingler *et al.*, 1989), dok je u *mop* tipu povezan sa genima *orto* puta razgradnje (Ehrt *et al.*, 1995). Pokazano je da sojevi koji su filogenetski slični sojevima kod kojih je okarakterisan *mop* tip mPH imaju gene za *orto* put razgradnje (Merimaa *et al.*, 2006). Postoje i bakterije kod kojih su pronađena oba tipa fenol hidroksilaza, i sPH i mPH, koje su povezane sa enzimima *meta* i/ili *orto* puta (Cafaro *et al.*, 2005; Merimaa *et al.*, 2006). Prisustvo oba tipa PH enzima bi moglo predstavljati selektivnu prednost ovih sojeva, jer oni najverovatnije mogu optimizovati iskorištavanje aromatičnih jedinjenja (Cafaro *et al.*, 2005). Operon sa genima koji kodiraju enzime za puteve razgradnje fenola se može nalaziti na plazmidu (Kivisaar *et al.*, 1991; Nurk *et al.*, 1991; Shingler *et al.*, 1989) ili na hromozomu (Ng *et al.*, 1994; Takeo *et al.*, 1995).

Najčešće se katehol i hlorokateholi razgrađuju posredstvom enzima katehol 1,2-dioksidaze, tj. podležu *orto* putu razgradnje (van der Meer, 1997). Ima i mikroorganizama koji poseduju gene *meta* puta razgradnje fenola, tj. u razgradnji katehola kod njih posreduje enzim katehol 2,3-dioksidaza (Kukor i Olsen, 1991). Međutim, samo mali broj mikroorganizama poseduje oba enzima (Jiang *et al.*, 2006).

Skoro sva monoaromatična jedinjenja se mogu razgraditi u aerobnim uslovima preko zajedničkog intermedijera, katehola (Harwood i Parales, 1996), što znači da katehol 1,2- i katehol 2,3- diokigenaza učestvuju i u putevima razgradnje i drugih aromatičnih jedinjenja, a ne samo fenola. Enzimi C12O i C23O su prvobitno identifikovani i okarakterisani kod Gram-negativnih bakterija (Hamzah i Al-Baharna, 1994; Harwood i Parales, 1996). Gram-pozitivne zemljišne bakterije, kao što su neki predstavnici rodova *Artrobacter* i *Rhodococcus*, kao i *Streptomyces setonii* takođe poseduju enzim C12O, ali su geni (*catA*) koji kodiraju ovaj enzim filogenetski različiti od *catA* kod Gram-negativnih bakterija, što ukazuje da su ova dva sistema verovatno evoluirala od različitih predaka (An *et al.*, 2001; Eck i Bettler, 1993; Eulberg *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1997; Strachan *et al.*, 1998).

Kako se broj izolovanih bakterija koje razgrađuju fenol i druga monoaromatična jedinjenja povećavao, postalo je očigledno da prajmeri koji su dizajnirani za genske familije ili više taksone nisu primenljivi u svim slučajevima (Junca i Pieper, 2003), zbog veoma velike heterogenosti u okviru familija. Kako bi se identifikovali funkcionalni geni koji kodiraju enzime puteva razgradnje aromatičnih jedinjenja, u novije vreme dizajnirani su setovi prajmera koji su specifični za pojedine grupe bakterija (Hendrickx *et al.*, 2006). Postoji ograničen broj podataka o enzimima uključenim u puteve razgradnje aromatičnih jedinjenja, kao i genima koji ove

enzime kodiraju kod Gram-pozitivnih bakterija, te je detekcija gena kod ovih bakterija otežana.



## II CILJ RADA

*Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* su endemoreliktne biljke koje se odlikuju specifičnim životnim ciklusom i povećanom koncentracijom fenolnih jedinjenja u rizosferi. Kako je fenol toksičan za većinu živih organizama, on u ovim sredinama oblikuje mikrobiološke zajednice selekcijom mikroorganizama koji imaju sposobnost da ga tolerišu ili razgrađuju. Zbog specifičnosti ovih rizosfera definisani su sledeći ciljevi:

- ✦ Analiza mikrobiološkog diverziteta u rizosferama *R. serbica* i *R. nathaliae* metodama nezavisnim od izolacije i kultivacije mikroorganizama. Radi postizanja ovog cilja biće korišćeni metagenomski pristup i FISH analiza;
- ✦ Izolacija bakterija iz rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae* koje tolerišu visoke koncentracije i imaju sposobnost razgradnje fenola;
- ✦ Biohemijska i molekularno-genetička karakterizacija bakterija koje razgrađuju fenol;
- ✦ Biohemijska i molekularno-genetička karakterizacija enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola kod izolovanih bakterija.

### III MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Uzorci zemljišta

Zemljište rizosfera endemoreliktnih biljaka *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* uzorkovano je u Jelašničkoj klisuri (jugoistočna Srbija), u martu 2004. godine. Fizičke i geochemijske karakteristike zemljišta opisane su u radu Quartacci i saradnici (2002).

#### 3.2. Bakterijski sojevi i plazmidi

U ovom radu korišćen je soj *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F,  $\Delta$ lac, U169( $\Phi$ 80 lacZ  $\Delta$ M15), *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *gyrA96*, *endA1*, *thi-1*, *relA1*).

Bakterijski sojevi tolerantni na fenol izolovani iz zemljišta rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae* označeni su od PS1 do PS13, odnosno od PN1 do PN10 (P od *eng.* phenol; S – *serbica*; N - *nathaliae*). Sojevi PS1, PS11, PS12 i PN1 imaju sposobnost rasta na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 i 2000 mg/l).

Sojevi *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aerations* ATCC 17853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Sarcina lutea* kao i gljivica

*Candida albicans* CBS 562 korišćeni su za testiranje antimikrobne aktivnost izolata metodom perpendikularnog zasejavanja (Egrov, 1985).

Produkcija bioaktivnih jedinjenja sa imunosupresorskom aktivnošću kod izolata testirana je na soju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FAV20 (Skoko *et al.*, 2005) koji je osetljiv na delovanje imunosupresora FK506/takrolimusa. YPD agar (poglavlje 3.3.5.) prelivan je prekonoćnom kulturom kvasaca rastvorenom u YPD „soft“ agaru, i preko toga je stavljan isečak agara sa bakterijama. Kulture su inkubirane preko noći na 30°C. Zona inhibicije rasta *S. cerevisiae* FAV20 ukazuje na produkciju bioaktivnog jedinjenja sa imunosupresorskim delovanjem. Kao kontrola korišćen je divlji soj kvasca *S. cerevisiae* FAS20.

Plazmidi korišćeni ili konstruisani u ovom radu prikazani su u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Korišćeni i konstruisani plazmidi.

PLAZMID	REFERENTNE KARAKTERISTIKE	REFERENCA
pUC19	Amp <sup>r</sup> , lacZ (2,7kb)	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUN1- pUN192	PCR fragment 16S rDNK iz uzorka zemljišta <i>R. nathaliae</i> ukloniran u pUC19 (4kb)	ovaj rad
pUS1-pUS80	PCR fragment 16S rDNK iz uzorka zemljišta <i>R. serbica</i> ukloniran u pUC19 (4kb)	ovaj rad
pUPS1	PCR fragment 16S rDNK soja PS1 ukloniran u pUC19 vektor (4kb)	ovaj rad
pUPS11	PCR fragment 16S rDNK soja PS11 ukloniran u pUC19 vektor (4kb)	ovaj rad
pUPS12	PCR fragment 16S rDNK soja PS12 ukloniran u pUC19 vektor (4kb)	ovaj rad
pUPN1	PCR fragment 16S rDNK soja PN1 ukloniran u pUC19 vektor (4kb)	ovaj rad
pUPH1	PCR fragment gena za fenol hidroksilazu (PH) iz soja PS1 ukloniran u pUC19 vektor (3,5kb)	ovaj rad
pUPH11	PCR fragment PH gena iz soja PS11 ukloniran u pUC19 vektor (3,5kb)	ovaj rad
pUPH12	PCR fragment PH gena iz soja PS12 ukloniran u pUC19 vektor (3,5kb)	ovaj rad
pUPHN	PCR fragment PH gena iz soja PN1 ukloniran u pUC19 vektor (3,5kb)	ovaj rad

### 3.3. Podloge za gajenje mikroorganizama

#### 3.3.1. Podloge za gajenje *E. coli* DH5 $\alpha$

LB (*eng.* Luria Broth) podloga sadrži: 10 g bako-triptona, 10 g NaCl, 5 g kvaščevog ekstrakta na 1 l destilovane vode, pH7,5. Za čvrste podloge (*eng.* Luria Agar, LA) dodavano je i 15 g agara na litar podloge. Transformisani klonovi su selektovani u prisustvu ampicilina (100  $\mu$ g/ml) u medijumu, dok je prisustvo funkcionalne  $\beta$ -galaktozidaze (plavo - bela selekcija) detektovano dodavanjem 40  $\mu$ g/ml X-gal rastvora (5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid) u LA podloge.

Bakterije su na čvrstoj podlozi sa X-gal-om gajene na 37°C u mraku, dok su prekončne kulture gajene u 5ml tečnog LB medijuma uz aeraciju na šejkeru sa horizontalnom platformom (37°C) mućkanjem pri 180 obrt/min.

#### 3.3.2. Hranljive bakterijske podloge

*Čvrste podloge:*

SC (*eng.* Starch Casein): 15 g agara, 10 g skroba, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 g KNO<sub>3</sub>, 2 g NaCl, 0,3 g kazeina, 0,05 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,02 g CaCO<sub>3</sub> i 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O na 1 l destilovane vode (Okazaki i Okami, 1972).

NE (*eng.* Nutrient Extract Agar), podloga za gajenje streptomiceta sadrži: 5 g peptona, 3 g mesnog ekstrakta, 15 g agara na 1 l destilovane vode, pH 7.0 (za podešavanje pH korišćen je 5M KOH).

*Tečna podloga:*

TSB (*engl.* Tryptic Soy Broth; Becton, Dickinson and Company, USA): 30 g Tryptic Soy Broth i 1 l vode.

### *3.3.3. Minimalna bakterijska podloga*

BS (*eng.* Basal Salt): 6 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g NaCl i 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na 1 l destilovane vode (pH 6 – 8). Čvrsta podloga je pravljena dodavanjem 15 g/l agara.

### *3.3.4. Diferencijalne podloge za gajenje bakterija iz roda Streptomyces*

Morfološke karakteristike bakterija iz roda *Streptomyces* testirane su na ISP (*eng.* International Streptomyces Project) podlogama (Shirling i Gottlieb, 1966). Streptomicete su gajene 7 dana na 30°C.

ISP2 medijum: 4 g kvašćevog ekstrakta, 10 g "malt" ekstrakta, 4 g glukoze, 15 g agara na 1 l tečne podloge, pH 7,3.



ISP3 medijum: 20 g ječma, 1 ml rastvora elemenata u tragovima (*eng.* Trace Element Solution, TES; 0,1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  na 100 ml destilovane vode), 18 g agara, pH 7,2. Podloga se priprema tako što se ječam kuva 20 minuta u 1 l destilovane vode a potom profiltrira i gubitak zapremine nadoknadi destilovanom vodom. pH je podešavana dodavanjem TES, nakon čega se dodaje agar (15 g/l).

ISP4 medijum je pripreman mešanjem rastvora A i B u odnosu 1:1. Rastvor A: 10 g skroba i 500 ml hladne vode. Rastvor B: 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g NaCl, 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g  $\text{CaCO}_3$ , 1 ml TES (istog sastava kao u podlozi ISP3) na 500 ml destilovane vode. Nakon mešanja rastvora A i B dodavano je 15 g agara.

ISP5 medijum: 10 g glicerola, 1 g L-asparagina, 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 ml TES (kao za ISP3), 15 g agara na 1 l destilovane vode, pH 7,0 - 7,4.

ISP6 medijum: 15 g peptona, 5 g proteaza peptona, 0,5 g  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{NH}_4\text{OH}$  (gvožđe amonijum citrata), 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,08 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 15 g agara, 1 g kvašćevog ekstrakta na 1 l destilovane vode, pH 7,0 - 7,2. Na ovoj podlozi je testirana sposobnost produkcije melanina kod streptomiceta.

ISP7 medijum: 15 g glicerola, 0,5 g L-tirozina, 1 g L-asparagina, 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g NaCl, 10 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml TES rastvora, 15 g agara na 1 l destilovane vode, pH 7,2 - 7,4.

ISP9 medijum: 2,64 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,38 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,65 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1ml Pridham i Gottlieb rastvora soli u tragovima (*eng.* Trace Salt Solution, TSS), 10% glukoze, 15 g agara na 1 l destilovane vode, pH 6,8 - 7,0 (za podešavanje pH korišćen je 1N NaOH ili 1N HCl). Pridham i Gottlieb TSS: 0,64 g  $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,11 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,79 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,15 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na 100 ml destilovane vode.

### 3.3.5 Podloge za gajenje kvasaca

YPD (*eng.* Yeast Peptone Dextrose) je podloga za gajenje kvasaca i sadrži: 10 g ekstrakta kvasca, 20 g peptona i 20 g dekstroze na 1 l destilovane vode. Za pravljenje čvrste podloge dodavan je agar u koncentraciji od 1,5%, dok je za YPD „soft“ agar dodavano 0,7% agara. Kvasac *S. cerevisiae* gajen je na 30°C preko noći.

### 3.4. Određivanje broja bakterija u uzorku

Kako bi se odredio broj jedinica koje formiraju kolonije (*eng.* Colony Forming Units, CFU) tj. ukupan broj vijabilnih bakterija u gramu zemljišta, potrebno je dovoljno razblažiti uzorak kako rast jedne kolonije ne bi inhibirao rast drugih kolonija na Petri šolji. Uzorci zemljišta su razblaživani destilovanom vodom, zasejavano je 100  $\mu\text{l}$

određenog serijskog razblaženja ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ), a broj CFU u gramu zemljišta određivan je na sledeći način:

$$\text{br. ćelija/g zemljišta} = \text{br. kolonija} \times 100 \times (1/\text{razblaženje})$$

### 3.5. Fluorescentna *in situ* hibridizacija (eng. Fluorescent *In situ* Hybridization, FISH)

#### 3.5.1. Fiksiranje i ispiranje uzoraka

Uzorci zemljišta rizosfera fiksirani su sa 4% paraformaldehidom u fosfatnom puferu (eng. Phosphate Buffer Saline, PBS; 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 130 mM NaCl; pH 7,2) 3 h na  $4^\circ\text{C}$  i potom ispirani tri puta PBS-om kako bi se uklonio višak fiksativa.

#### 3.5.2. Bojenje uzoraka 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI)

Talozi iz prethodnog koraka su ratvoreni u DAPI rastvoru (50  $\mu\text{g}$  DAPI u 1 ml PBS-a) i inkubirani 5 minuta. Višak DAPI boje otklanjan je ispiranjem uzoraka PBS-om. Eksperiment je rađen u duplikatu.

### 3.5.3. FISH

Po jedan uzorak iz obe rizosfere hibridizovan je sa 16S rRNK probom obeleženom rodaminom, EUB338 proba (Lee *et al.*, 1999), a drugi sa nespecifičnom probom, takođe obeleženom rodaminom, NONEUB338 proba. Kako bi se otklonile razlike u relativnom intenzitetu obojenosti proba i nespecifičnom vezivanju rodaminskog dela probe, u kontrolnim eksperimentima dodavana je neobeležena proba u suvišku. Uzorci su filtrirani kroz polikarbonatni filter (Milipore Corporation, USA), kako bi se sakupile bakterije iz uzorka. Bakterije su sa filtera prebačene na mikroskopsku pločicu stavljanjem filtera preko kapi sterilne vode. Posle 30 minuta sušenja na vazduhu, filteri su sklonjeni sa mikroskopske pločice, koja je zatim 15 minuta tretirana rastvorom metanola i formalina (90:10 vol/vol), ispirana sterilnom vodom i osušena na vazduhu. Bakterije su prebrojavane na fluorescentnom mikroskopu (Olympus BX51, GmbH, Germany).

### 3.6. Izolacija bakterija iz zemljišta pretretiranog fenolom

Jedan gram zemljišta rastvoren je u 100 ml 5 mM kalijum fosfatnog pufera ( $K_2HPO_4:KH_2PO_4$ ; pH 7), koji je sadržao fenol u finalnoj koncentraciji od 1,5%. Suspenzija je inkubirana sat vremena na 30°C uz povremeno mešanje. Bakterije su

izolovane na SC agaru metodom zasejavanja serijskih razblaženja uzoraka. Ove bakterije su smatrane tolerantnim na fenol.

### 3.7. Bakterije koje razgrađuju fenol

#### *3.7.1. Optimalni uslovi za rast bakterija na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika*

Kako bi se testirala sposobnost bakterija za rast na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika, fenol tolerantne bakterije gajene su u minimalnom medijumu (*eng.* Basal Salt, BS) sa dodatkom 400 mg/l fenola. Optimalni uslovi za rast bakterija koje razgrađuju fenol određivani su njihovim gajenjem na različitim temperaturama (28, 30, 37, i 40°C) i pH (pH 6 do 8). Sposobnost razgradnje fenola testirana je gajenjem bakterija u optimalnim uslovima za njihov rast u prisustvu različitih koncentracija fenola (200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 mg/l).

#### *3.7.2. Stopa rasta i profil razgradnje fenola*

Iskorištavanje fenola je određivano po Chen-u (2004). Bakterije su gajene u BS-u uz dodatak fenola u finalnoj koncentraciji od 400 mg/l na 30°C, 7 dana uz mešanje na 200 obrt/min. Suva masa bakterija određivana je filtriranjem bakterijskog taloga.

Supernatant je korišćen za određivanje koncentracije fenola kolorimetrijskim esejem sa 4-amino-antipirinom (Martin, 1949).

### 3.8. Izolovanje ukupne DNK iz bakterijskih sojeva

Ova metoda se pre svega koristi za izolovanje ukupne DNK iz bakterija roda *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985), ali se pokazala i kao veoma efikasna i za izolaciju DNK iz drugih bakterija.

Oko 50 mg bakterijskog taloga rastvoreno je u 0,5 ml rastvora za lizu (0,3 M saharoza, 0,025 M TRIS, 0,025 M EDTA u destilovanoj vodi) koji je sadržao 2 mg/ml lizozima i 50 µg/ml RNaze, i inkubirano od 30 minuta do sat vremena na 37°C uz povremeno mućkanje. Potom je dodavano 250 µl 2% SDS i suspenzija je intenzivno mućkana na vorteksu oko jedan minut. Dodavanjem 250 µl neutralnog fenola i intenzivnim mućkanjem, a potom i centrifugiranjem u trajanju od 5 minuta na 13 000 obrt/min, odstranjuju se proteini i komponente bakterijske membrane, koje ostaju u interfazi. Supernatant se podvrgava koraku dodavanja fenola sve do potpunog gubitka interfaze. DNK se potom precipitira dodavanjem jedne desetine volumena natrijum acetata (3M CH<sub>3</sub>COONa; pH 4,8), jednog volumena izopropanola i inkubacijom od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak se centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, ukloni supernatant i talog rastvori u 500 µl TE purefa (10mM Tris,



pH 7,5; 1mM EDTA, pH 7,5) kome je dodato 25  $\mu$ l 100 mM spermin HCl. Posle inkubacije od 5 minuta uzorak se centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, odlije supernatant, talog rastvori u 300  $\mu$ l 0,3 M natrijum acetata i 10 mM MgCl<sub>2</sub>, doda 1 ml hladnog apsolutnog etanola (-20°C) i inkubira sat vremena na sobnoj temperaturi. Uzorak se potom centrifugira 5 minuta na 13 000 obrt/min, odlije supernatant, talog osuši i potom rastvara preko noći na 4°C u 100  $\mu$ l destilovane vode.

### 3.9. Izolovanje ukupne (metagenomske) DNK iz zemljišta

U 2,5 ml ekstrakcionog pufera (120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8; 1% SDS) dodato je približno 1g zemlje (suva težina) i lizozima u finalnoj koncentraciji 5 mg/ml. Uzorak je inkubiran 1h na 37°C uz povremeno mešanje. Posle dodavanja proteinaze K (100  $\mu$ g/ml), uzorak je inkubiran 1h na 37°C. Koncentracija soli u uzorku povećana je dodavanjem 450  $\mu$ l 5 M NaCl, potom i 375  $\mu$ l 10% CTAB (CTAB u 0,7 M NaCl). Uzorak je promešan na vorteksu i inkubiran 20 minuta na 65°C, a potom centrifugiran 10 minuta na 6 000 obrt/min (Saano i Lindstrom, 1995). Talog je ispiran dva puta 70% etanolom, a potom je DNK rastvorena u 50  $\mu$ l destilovane vode. Kako bi se DNK oslobodila od nečistoća i humusne kiseline prečišćavana je prvo fenol hloroformom, a potom i elektroelucijom iz 1% agaroznog gela.

### 3.10. Agarozna gel elektroforeza

Rezultati izolacije DNK, reakcije lančane polimerizacije i sečenja restrikcijom enzimima analizirani su horizontalnom elektroforezom na 0,7%, 1% ili 2% agaroznim gelovima (0,7 g, 1 g ili 2 g agaroze, 90 ml vode, 10 ml 10xTBE pufera). Puffer 10xTBE, u 1 l vodenog rastvora, sadrži 109 g TRIS-a, 55,6 g borne kiseline i 9,3 g EDTA. Etidijum bromid je dodavan u gel za elektroforezu u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 9 V po dužnom centimetru gela.

Veličina DNK fragmenata je određivana poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase. Kao marker molekulskih veličina korišćen su DNK – *EcoRI/HindIII* (564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3503, 4268, 4973, 5248, 21226 bp), O'RangeRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 1500 bp; Fermentas UAB, Lithuania) i O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker (100 – 3000 bp; Fermentas UAB, Lithuania).

Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje (bromfenol plavo ili oranž G), a detekcija uzoraka na gelu vršena je osvetljavanjem gela ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Germany).

### 3.11. Prečišćavanje DNK fenolom

Uzorak DNK je razblaživan vodom do finalne zapremine od 200  $\mu$ l. Po dodavanju iste zapremine neutralnog fenol-hloroforma (1:1), uzorak se dobro promeša i centrifugira (10 minuta, 16 000 obrt/min, 4°C). Gornja, vodena faza, je pažljivo prebacivana u čiste epruvete, a zatim je DNK precipitirana dodavanjem 1/10 volumena 3M Na-acetata i 2,5 volumena hladnog apsolutnog etanola (-20°C). Nakon inkubacije na -20°C u trajanju od 20 minuta precipitat je taložen centrifugiranjem (20 minuta, 16 000 obrt/min, +4°C). Dobijeni talog je ispiran hladnim 70% etanolom (-20°C), zatim osušen pod vakuumom i rastvoren u vodi.

### 3.12. Elektroelucija

Za izolaciju fragmenata DNK dobijenih sečenjem bilo restrikcionim enzimima bilo u PCR reakciji, iz agaroznog gela su isecani delovi u kojima se nalazi željeni fragment DNK. Isečeni komad gela stavljen je u crevo za dijalizu ispunjeno TBE puferom. Pod uticajem električnog polja (100 V, 1h) DNK je izlazila iz gela u pufer koji je sakupljen (Sambrook *et al.*, 1989). Etidijum bromid je ekstrahovan izoamil alkoholom (zapreminski odnos 1:1), a DNK je precipitirana iz pufera etanolom.

### 3.13. Obrada DNK restrikcionim endonukleazama

Plazmidna DNK sečena je restrikcionim endonukleazama (Sambrook *et al.*, 1989) u komercijalnim puferima u zavisnosti od korišćenih enzima. Uslovi sečenja DNK restrikcionim enzimima kao što su količina enzima, pufer i temperatura inkubacije određivani su prema savetu proizvođača.

#### 3.13.1. ARDRA/RFLP analiza (eng. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Ova metoda podrazumeva analizu umnoženih 16S rDNK sečenjem restrikcionim enzimima i njihovo grupisanje u operativne taksonomske jedinice (OTJ) na osnovu profila elektroforetske pokretljivost na agaroznom gelu. ARDRA analiza urađena je enzimom *RsaI* (Pharmacia, Sweden).

### 3.14. Ligiranje DNK fragmenata

Za ligiranje DNK molekula korišćena je T4 DNK ligaza po uputstvu proizvođača (Fermentas UAB, Lithuania). Ligaciona smeša je inkubirana na 22°C u trajanju od

najmanje 2 sata. Molarna koncentracija inserta u reakciji bila je tri do pet puta veća od koncentracije vektora da bi se favorizovala intermolekulska ligacija.

### 3.15. Priprema i transformacija kompetentnih *E. coli* ćelija

Kompetentne *E. coli* DH5 $\alpha$  ćelije su pripremane tako što su uzgajane u LB medijumu na 37°C uz snažnu aeraciju, do optičke gustine kulture od 0,5 na 600 nm (Hanahan, 1983). Nakon toga ćelijski rast je zaustavljen hlađenjem kulture (10 minuta na 4°C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, 6 000 obrt/min na 4°C, Sorvall SS34 rotor), ćelije iz taloga su resuspendovane u istoj zapremini hladnog 0,1 M CaCl<sub>2</sub> i inkubirane 15 minuta na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su taložene kao i ranije, zatim nežno resuspendovane u 12,5 puta manjoj zapremini hladnog RF2 pufera (10 mM MOPS, pH 6,8; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% glicerol) i inkubirane 15 minuta na ledu. Po završenoj inkubaciji, suspenzija ćelija je podeljena u alikvote od po 0,2 ml koji su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80°C do korišćenja.

Prilikom korišćenja, zamrznute kompetentne ćelije su otapane na ledu. Suspenziji kompetentnih ćelija dodavana je DNK (u zapremini manjoj od 20  $\mu$ l, ukupne količine DNK manje od 0,2  $\mu$ g) i suspenzija je inkubirana 10 do 60 minuta na ledu. Nakon inkubacije ćelije su izlagane termičkom stresu u trajanju od 2 minuta na 42°C i 5 minuta na ledu. Ćelije su posttransformaciono oživljavane dodavanjem 0,8

ml neselektivnog bogatog medijuma i inkubiranjem uz intenzivnu aeraciju od 30 do 60 minuta. Čelije su zatim razmazivane na selektivne podloge i inkubirane na 37°C do pojave transformanata. Efikasnost transformacije bila je od  $10^5$  -  $10^7$  transformanata po  $\mu\text{g}$  DNK.

### 3.16. Prajmeri korišćeni u ovom radu

Prajmeri korišćeni u ovom radu prikazani su u tabeli 3.2.



Tabela 3.2. Prajmeri korišćeni u reakcijama polimerizacije.

Upotreba	Naziv	Sekvenca prajmera	Referenca
		5' 3'	
16S rRNK	27f	GTTTGATCCTGGCTCAG	Lane, 1991
	1389r	GACGGGCGGTGTGTACAA	Marchesi <i>et al.</i> , 1998
PH	PhehF	CG(G/T)ATGAC(G/C)TACGGCTCCATGGGCG	Sandhu <i>et al.</i> , 2009
	PhehR	ACGTCCTGTTCTGAATGGATATCTCCTTGATGC	Sandhu <i>et al.</i> , 2009
C12O	C12OF	GCCAACGTCGACCGTCTGGCA	Sei <i>et al.</i> , 1999
	C12OR	CGCCTCAAAGTTGATCTGCGTGGT	Sei <i>et al.</i> , 1999
C23O	C23OF	AAGAGGCATGGGGGCGCACCGTTCGATCA	Sei <i>et al.</i> , 1999
	C23OR	CCAGCAAACACCTCGTTGTTGCGTTGCC	Sei <i>et al.</i> , 1999
C12O	C12F	GA(G/A)TGGCC(G/A/T/C)(T/C)T(G/A/T/C)TT(T/C)(T/C)T(G/A/T/C)GA(T/C)GT(G/A/T/C)	An <i>et al.</i> , 2001
	C12R	(G/A/T/C)A(G/A)(G/A)TG(G/A/T/C)A(G/A)(G/A)TG(G/A/T/C)GC(G/A/T/C)GG(G/A/T/C)CGCCA	An <i>et al.</i> , 2001
C23O	C23F	CG(G/T)ATGAC(C/G)TACGGCTGGATGGGCG	ovaj rad*
	C23R	ACGTCCTGTTCTGATGATCTCCTTGATCCGC	ovaj rad*
Sekvenc.	M13f	GTAAAACGACGGCCAGT	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
	M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

PH – fenol hidroksilaza (*eng.* phenol hydroxylase); C12O – katehol 1,2–dioksigenaza (*eng.* catechol 1,2–dioxygenase); C23O – katehol 2,3–dioksigenaza (*eng.* catechol 2,3–dioxygenase);

\* Prajmeri su konstruisani za konzervirane regione ovih enzima iz Gram-pozitivnih bakterija.

### 3.17. Sinteza DNK u reakciji lančane polimerizacije

Reakcija lančane polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR) zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju: *in vitro* denaturacija dvolančane DNK matrice, hibridizacija (aniling od *eng.* annealing) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza i ekstenzija prajmera DNK polimerazom.

U reakcijama polimerizacije svaki od prajmera bio je u koncentraciji od 50 pmol. PCR reakciona smeša sadržala je još i dNTP smešu u koncentraciji od 2 mM, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3% DMSO, 1xPfu polimerazni pufer bez MgCl<sub>2</sub> i 1,25U Pfu polimeraze po reakciji. Finalna zapremina reakcije je iznosila 50 µl, koja je podešavana dodavanjem destilovane vode.

Za amplifikaciju korišćen je GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA) i sledeći programi, prikazani u Tabeli 3.3.



Tabela 3.3. PCR programi korišćeni u ovom radu.

Upotreba	Temperatura	Vreme	Faza reakcije	Broj ciklusa
Amplifikacija 16S rDNK iz metagenoma	95°C	3 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje <sup>a</sup>	15
	60°C, $\Delta = -1^\circ\text{C}$	1 minut		
	72°C	2,5 minuta		
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje <sup>a</sup>	10
	45°C	1 minut		
	72°C	2,5 minuta		
	72°C	10 minuta	Finalna elongacija	1
Amplifikacija 16S rDNK fenol razgrađujućih bakterija	95°C	5 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje <sup>a</sup>	30
	55°C	1 minut		
	72°C	2,5 minuta		
	72°C	10 minuta	Finalna elongacija	1
Amplifikacija gena za PH, C12O i C23O	95°C	3 minuta	Denaturacija DNK	1
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje <sup>a</sup>	15
	65°C, $\Delta = -1^\circ\text{C}$	1 minut		
	72°C	2,5 minuta		
	95°C	40 sekundi	Umnožavanje <sup>a</sup>	10
	50°C	1 minut		
	72°C	2,5 minuta		
	72°C	10 minuta	Finalna elongacija	1

<sup>a</sup>Ovaj korak podrazumeva denaturaciju DNK, hibridizaciju prajmera i elongaciju.

### 3.18. Metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli*

Za izolaciju plazmidne DNK iz *E. coli* sojeva korišćena je metoda zasnovana na alkalnoj lizi (Birnboim i Doly, 1979). Talog dobijen centrifugiranjem 5 ml prekonoćne kulture, koja je rasla na 37°C uz aeraciju od 180 obrt/min, resuspendovan je u 100 µl rastvora PI (50 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 100 µg/ml RNaze I). Potom se dodaje 200 µl rastvora PII (0,2 M NaOH, 1% SDS), lagano meša, i doda još 150 µl rastvora PIII (3 M CH<sub>3</sub>COOK, pH 5,5). Uzorak se lagano promeša okretanjem 1,5 ml epruvete. Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 minuta, uzorci su centrifugirani (sobna temperatura, 13 000 obrt/min; Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Dobijeni supernatant, u kome se nalazi plazmidna DNK, prebacivan je u čiste 1,5 ml epruvete, a zatim je vršena precipitacija dodavanjem 500 µl apsolutnog etanola (-20°C) uz centrifugiranje u trajanju od 10 minuta (sobna temperatura, 13 000 obrt/min; Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Po odlivanju supernatanta talog je resuspendovan u 500 µl rastvora PIV (100 mM CH<sub>3</sub>COONa, pH 6), a potom je vršena precipitacija dodavanjem 1 ml apsolutnog etanola (-20°C) i centrifugiranjem (10 minuta na sobnoj temperaturi, 13 000 obrt/min; Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Dobijeni talog je sušen pod vakuumom i rastvaran u 100µl TE pufera (10mM Tris, pH 7,5; 1mM EDTA, pH 7,5) ili destilovane vode.

### 3.19. Određivanje biohemijskih i fizioloških osobina izolovanih sojeva

#### 3.19.1. *Lecitinaza test*

Hranljiva GUNNU podloga je hranljivi agar sa 7,5% NaCl i 1% manitolom. Podloga je sterilisana, prohlađena do 45°C i u podlogu je dodato sveže homogenizovano žumance jajeta u finalnoj koncentraciji od 2%. Kulture su zasejavane i inkubirane 24 h na optimalnoj temperaturi (30°C). Lecitinaza pozitivni mikroorganizmi stvaraju zonu prosvetljenja oko kolonija (Tindall *et al.*, 2007).

#### 3.19.2. *Lipaza test*

Podloga za dokazivanje prisustva lipaze: 10 g peptona, 5 g NaCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub>, 20 g agara i 0,5 g Tween 80 na 1 l destilovane vode. Podloga se sterilise u autoklavu u trajanju od 30 minuta na 110°C. Zasejane kulture inkubirane su 24 h na optimalnoj temperaturi (30°C). Lipaza pozitivni organizmi stvaraju zonu prosvetljenja oko kolonija (Tindall *et al.*, 2007).

### 3.19.3. Redukcija nitrata

Ovim biohemijskim testom dokazuje se sposobnost mikroorganizama da redukuju nitrate u nitrite. Podloga za ovaj test sadrži 0,2 g  $\text{KNO}_3$ , 5 g peptona na 1 l destilovane vode, pH 7,4. Podloga je razlivana u epruvete po 5 ml, i sterilisana u autoklavu 20 minuta na  $121^\circ\text{C}$ . Nakon zasejavanja, ispitivane kulture su inkubirane 4 dana na optimalnoj temperaturi rasta ( $30^\circ\text{C}$ ). Nakon inkubacionog perioda u epruvete je dodavano po 0,1 ml rastvora A i 0,1 ml rastvora B. Pojava crvene boje je znak pozitivne reakcije. Rastvor A: 0,8 g sulfanilne kiseline na 100 ml glacijalne sirćetne kiseline. Rastvor B: 0,5 g alfa-naftilamina na 100 ml glacijalne sirćetne kiseline (Tindall *et al.*, 2007).

### 3.19.4. Dokazivanje vodonik sulfida ( $\text{H}_2\text{S}$ )

Proizvodnja vodonik sulfida je proveravan na 2 načina (Tindall *et al.*, 2007):

(1) Ispitivani mikroorganizam zasejavani su na TSI (*eng.* Triple Sugar Iron) gotovu podlogu (Torlak, Srbija). Ukoliko ispitivani mikroorganizam oslobađa  $\text{H}_2\text{S}$ , oslobođeni  $\text{H}_2\text{S}$  će sa jonima gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) iz podloge formirati  $\text{FeS}$  i tako obojiti podlogu u crno;



(2) Sojevi su gajeni na sulfitnom agaru (Torlak, Srbija), na kome se kolonije boje u crno ukoliko proizvode vodonik sulfid.

#### *3.19.5. Ispitivanje rasta u prisustvu natrijum azida, talijum acetata ili kalijum telurita*

U hranljivi neutralni agar koji je sadržao 5 g peptona, 1,5 g mesnog ekstrakta, 5 g NaCl, 1,5 g kvašćevog ekstrakta i 15 g agara na 1 l destilovane vode dodavano je 0,01% natrijum azida, ili 0,001% talijum acetata ili 0,001% kalijum telurita. Zasejane ispitivane kulture inkubirane su 5 dana na 30°C.

#### *3.19.6. Ispitivanje razgradnje fenilalanina*

Fenilalanin agar (Torlak, Srbija) izliven je u epruvete koje su nakon sterilizacije (20 min na 121°C) iskošene i ostavljene u tom položaju da se podloga stegne. Na kosini zasejavan je ispitivani mikroorganizam. Nakon inkubacije od 5 dana na 30°C kosina je prelivana rastvorom 10% FeCl<sub>3</sub>. Pojava zelene boje predstavlja pozitivnu reakciju (Tindall *et al.*, 2007).

### *3.19.7. Ispitivanje sposobnosti korišćenja različitih šećera*

Andrade peptonska voda (Torlak, Srbija) je indikator kiselosti, i crvena je u kiseloj sredini. Ukoliko ispitivani mikroorganizam koristi šećer, nakon razlaganja šećera opada pH podloge i podloga menja boju iz žute u crvenu. U podlogu je dodavan 1% mezo-inozitol, finalno. Po 5 ml podloge je razlivano u epruvete i sterilisano u autoklavu 20 minuta na 121°C. Ispitivane kulture su inkubirane 24 do 48 h na 30°C. Isti postupak je ponovljen i za trehalozu i adonitol (Tindall *et al.*, 2007).

Dodavanjem L(+)-arabinoze, D(-)-fruktoze, D(+)-galakte, D(+)-glukoze,  $\alpha$ -laktoze,  $\alpha$ -melibioze, D(+)-manitola, D(+)-rafinoze, L(+)-ramnoze, D(-)-saharoze, D(+)-ksiloze, D(-)-maltoze, glicerola, D(-)-sorbitola, celobioze, D(+)-manoze u koncentraciji od 1% u BS medijum (poglavlje 3.3.3.) ispitivano je korišćenja ovih šećera i šećernih alkohola. Pre zasejavanja bakterija pH medijuma podešena je na 7. Nakon 7 dana praćen je rast bakteija i promena pH medijuma.

### *3.19.8. Ispitivanje korišćenja različitih izvora azota*

U minimalnom medijumu (BS) bez  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sa 1% šećerom, ispitivan je rast mikroorganizama u prisustvu sledećih aminokiselina: L-cisteina, L-histidina, L-

fenilalanina, L-prolina, L-valina, L-arginina, L-lizina, L-glicina, L-asparagina, L-alanina i L-metionina.

#### *3.19.9. Rast na različitim koncentracijama NaCl*

Ispitivani sojevi su zasejavani u 10 ml TSB sa rastućim koncentracijama NaCl, od 1% - 10% i inkubirani na 30°C (250 obrt/min, šejker sa horizontalnom platformom). Rast mikroorganizama praćen je 7 dana.

#### *3.19.10. Ispitivanje hidrolize eskulina*

Po 5 ml eskulin bujona (Torlak, Srbija) je razliveno u epruvete i sterilisano u autoklavu (20 minuta, 121°C). Nakon zasejavanja, ispitivane kulture su inkubirane 48 h na 30°C. Detekcija je vršena dodavanjem nekoliko kapi 10% FeCl<sub>3</sub>. Crna boja predstavlja indikator da soj razlaže eskulin (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.11. Ispitivanje korišćenja citrata*

Simonsov citratni agar (SCA) sadrži 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g natrijum citrata, 5 g NaCl, 0,08 g brom-timol plavog i 15 g agara na 1 l destilovane

vode. Na SCA podloge zasejavani su ispitivani mikroorganizmi i inkubirani 48 h na 30°C. Promene boje podloge iz zelene u plavu ukazuje da ispitivani soj koristi citrate kao izvor energije (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.12. Ispitivanje hidrolize želatina*

Proteolitička sposobnost ispitivanih sojeva testirana je na podlozi koja sadrži želatin. Pripremljen je podloga koja sadržala 3 g mesnog ekstrakta, 10 g peptona, 150 g želatina na 1 l destilovane vode, pH 7,2. Podloga je potom razlivena u epruvete (po 5 ml) i sterilisana u autoklavu 20 minuta na 121°C. Sojevi su zasejavani ubadanjem eze do dna epruvete. Nakon inubacije od 3 do 5 dana na 30°C, epruvete su stavljene u frižider. Ukoliko se nakon 10 minuta podloga stegne reakcija je negativna, a ukoliko podloga ostane tečna reakcija je pozitivna, tj. ispitivani soj poseduje proteolitičke sposobnosti (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.13. Ispitivanje prisustva katalaze*

Ezom je zahvatana velika količina ćelija sa čvrste podloge koje su potom nanošene na sterilnu Petri šolju. Na ćelije je sipano 1 - 2 kapi 3% vodonik peroksida. Ukoliko

ispitivani soj poseduje katalazu dolazi do burne reakcije uz oslobađanje mehurića kiseonika (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.14. Ispitivanje hidrolize uree*

Christensen urea agar (Torlak, Srbija) razliven je u epruve (po 5ml) i sterilisan 20 minuta na 121°C. Epruvete su iskošene i ostavljene da se stegnu. Ohlađena i stvrdnuta podloga ima žutu boju. Zasejavanje je vršeno po kosini, a potom je zasejana podloga inkubirana 24 – 72 h na 30°C. Ukoliko mikroorganizam razlaže ureu pojavljuje se crvena boja (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.15. Ispitivanje produkcije indola*

Pripremljen je bujon koji je sadržao 20 g peptona i 5 g NaCl na 1 l destilovane vode. Bujon je razliven u epruvete po 5 ml i sterilisan u autoklavu 20 minuta na 121°C. Nakon zasejavanja ispitivani sojevi su inkubirani 24 – 72 h na 30°C i potom je dodat 1 ml reagensa po Ehrlich-u. Pojava crvenog prstena označava da mikroorganizam proizvodi indol (Tindall *et al.*, 2007).

Reagens po Ehrlich-u: 8 g p-dimetilaminobenzaldehida, 760 ml 96% etanola i 160 ml koncentrovane HCl.

### 3.19.16. Ispitivanje prisustva DNaze

Pripremljena je gotova podloga DNaza agar (Becton, Dickinson and Company, USA). Ispitivani sojevi zasejavani su tako što je ezom povučena jedna prava crta preko sredine podloge koja je potom inkubirana 24 – 48 h na 30°C. Detekcija prisustva DNaze vršena je 0,01% toluidin plavim, koji je prelivan preko podloge. Ukoliko ispitivani soj proizvodi DNazu, nakon par sekundi se oko kolonija javlja svetlo roze boja (Tindall *et al.*, 2007).

### 3.19.17. Detekcija hemolizina

Mnoge patogene i oportunistički patogene bakterije proizvode hemolizine, ekstracelularne proteine koji dovode do oštećenja citoplazmatične membrane različitih tipova animalnih ćelija, što uslovljava njihovo liziranje. Produkcija hemolizina najlakše se detektuje putem liziranja eritrocita i oslobađanja hemoglobina. Hemolizini se mogu smatrati egzotoksinima i samo neki od njih poseduju enzimska svojstva (Tindall *et al.*, 2007).

Krvni agar je napravljen tako što je u sterilisani i prohlađeni hranljivi agar (50 - 60°C) dodata defibrinisana ovčija krv u finalnoj koncentraciji od 6%. Sveže pripremljen krvni agar je crvene boje. Ukoliko bakterije stvaraju hemolizine, oko

bakterijskih kolonija se pojavljuju prosvetljenja tj. zone hemolize u kojima je došlo do liziranja eritrocita. Na osnovu izgleda zone hemolize razlikuju se  $\alpha$  i  $\beta$ -hemoliza.  $\beta$ -hemoliza se odlikuje kompletnom lizom eritrocita i dekolorizacijom hemoglobina zbog čega je zona hemolize potpuno svetla, dok  $\alpha$ -hemoliza podrazumeva delimičnu lizu eritrocita i redukciju hemoglobina u methemoglobin zbog čega je zona zelenkaste boje (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.18. Ispitivanje rasta na Sabouraud dekstroznom agru*

Sabouraud dekstrozni agar je selektivna podloga koja se koristi za kultivaciju gljivica i nekih vrsta aktinomiceta. Korišćena je gotova Sabouraud podloga (Torlak, Srbija).

#### *3.19.19. CAMP (Christie, Atkins and Muench-Petersen) fenomen na Staphylococcus aureus*

Na krvnom agru (poglavlje 3.19.17.) zasejan je *Staphylococcus aureus* kao prava crta preko sredine podloge, od ivice do ivice Petri šolje. Normalno u odnosu na *S. aureus* zasejavani su ispitivani sojevi. Tako zasejane podloge inkubirne su 24 h na 30°C. Smatra se da je ispitivani mikroorganizam pozitivan na CAMP fenomen ukoliko se



pojavi zona  $\beta$ -hemolize u zoni dodira dva mikroorganizma, što predstavlja sinergizam u hemolitičkoj aktivnosti (Tindall *et al.*, 2007).

#### *3.19.20. Ispitivanje osetljivosti na različite antibiotike „gradient-plate” metodom*

Prazna sterilna Petri šolja izdignuta je sa jedne strane oko 1,6 mm, a potom je u nju razliveno 10 ml NE podloge. Kada NE podloga počne da se steže, šolja se vraća u horizontalan položaj i preliva sa još 10 ml NE podloge sa antibiotikom (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Na taj način dobija se podloga sa gradijentom koncentracije antibiotika od 0 do 100  $\mu\text{g/ml}$  (Tindall *et al.*, 2007). Ispitavana je osetljivost sojeva na sledeće antibiotike: apramicin, gentamicin, tetraciklin, tiostrepton, ampicilin, eritromicin, hloramfenikol i spektinomycin. Sojevi su zasejavani sa jednog kraja Petri šolje na drugi i inkubirani 7 dana na 30°C.

#### *3.19.21. Bojenje bakterija*

##### *3.19.21.1. Bojenje po Gram-u*

Metoda bojenja bakterija rađena je po proceduri koju je opisao Gram. Na mikroskopsku pločicu nanošena je kap bakterijske suspenzije i pravljen je razmaz. Razmaz je prvobitno sušen na vazduhu a potom fiksiran na plamenu. Fiksiran

preparat je bojen tako što je nanošena kap gencijana violet (Sinex Laboratory, Srbija) i inkubiran 2 minuta. Boja je ispirana vodom, a potom je nanošena kap lugolovog rastvora (J<sub>2</sub> u KJ; Sinex Laboratory, Srbija) i preparat inkubiran 2 minuta. Višak lugola je odlivan, potom je dodavana kap 96% etanola i preparat je inkubiran 30 sekundi. Potom je dodavana kap fuksina (Sinex Laboratory, Srbija) i nakon inkubacije od 30 sekundi preparat je ispran vodom, i isušen filter papirom. Preparat je posmatran pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, U-RFLT-T, GmbH, Germany).

#### *3.19.21.2. Bojenje po Ziehl–Neelsen-u*

Bojenje po Ziehl–Neelsen-u (*eng.* Acid fast staining) se koristi za identifikaciju tzv. acidorezistentnih bakterija koje sadrže visok procenat lipida u ćelijskom zidu (do 60%). Na mikroskopskoj pločici napravljen je razmaz bakterijske kulture koji je potom fiksiran na plamenu. Zatim je preparat preliven karbol fuksinom (Sinex Laboratory, Srbija) i zagrevan do pojave pare (5 - 10 minuta). Nakon hlađenja preparat je ispran destilovanom vodom do potpunog gubitka crvene boje. Odbojavanje je vršeno kiselim rastvorom alkohola (3 ml koncentrovane HCl i 97 ml 96% alkohola) u trajanju 20 - 30 sekundi. Preparat je potom ispiran destilovanom vodom, preliven metilenskim plavim (Sinex Laboratory, Srbija) i ostavljen da odstoji 2 - 3 minuta nakon čega je

ponovo ispran destilovanom vodom (Tindall *et al.*, 2007). Osušen preparat je posmatran pod svetlosnim mikroskopom (Olympus U-RFLT-T, GmbH, Germany).

### 3.20. Određivanje GC sastava

GC sastav DNK molekula se može odrediti na osnovu hiperhromnog efekta. Hiperhromni efekat predstavlja fenomen rasta apsorbance DNK na talasnoj dužini od 260nm ( $A_{260}$ ) usled denaturacije DNK molekula. Temperatura topljenja ( $T_m$ ) je temperatura na kojoj je 50% lanca DNK molekula denaturisano.  $T_m$  se određuje praćenjem denaturacije DNK molekula pri linearnom porastu temperature, pri čemu će vrednost apsorbance  $A_{260}$  rasti kako raste temperatura. Pri određivanju  $T_m$  za fragmente DNK veće od 40 bp, mora se voditi računa da vrednost  $T_m$  zavisi kako od dužine, tako i od koncentracije i sekvence DNK molekula i jonske jačine pufera koji su korišćeni prilikom izolacije DNK.

U ovom radu  $T_m$  je izračunata pomoću SWIFT II programa (spektrofotometar UV/VIS Ultrospec 3300 Pro; GE Healthcare, UK) metodom prvog izvoda. Izolovano je 200  $\mu\text{g/ml}$  genomske DNK iz kulture stare 2 dana po proceduri opisanoj u poglavlju 3.8. Na osnovu vrednosti  $T_m$  preračunat je i GC sastav po sledećoj formuli:

$$\%G+C = (T_m - 69,3) / 0,41.$$

3.21. Određivanje izomera diaminopimelinske kiseline (DAP) u ćelijskom zidu bakterije metodom tankoslojne hromatografije (*eng.* Thin Layer Chromatography, TLC)

Tri miligrama micelijuma soja PN1 isušenog do suva u vakuum uparivaču (Concentrator 5301, Eppendorf, Germany) hidrolizovano je 18 h na 100°C u 6 N HCl. Hidrolizat je profiltriran kroz Whatman papir no. 1 i filtrat uparen do suva na 100°C. Talog je rastvoren u 1 ml destilovane vode, ponovo uparen do suva i rastvoren u 300 µl destilovane vode. Uzorci u zapremini od 2 µl su nanešeni na bazalnu liniju, koja se nalazila 5 cm od početka TLC ploče sa indikatorom (*eng.* Cellulose fluorescent indicator). Kao marker na TLC ploču nanesen je 1 µl 0,01M DL DAP standarda (mezo i LL diaminopimelinska kiselina). TLC ploča je potom stavljena u komoru zasićenu parom TLC rastvarača (metanol:destilovana voda:6 N HCl:pidin u donosu 80:26:4:10). Kada je front rastvarača bio na 2 cm od kraja ploče, TLC ploča je isušena na vazduhu i potom isprskana razvijanjem (0,2% ninhidrin u acetonu). Ploča je potom grejana 3 minuta na 100°C u vakuum pećnici (Komagata i Suzuki, 1987). Sivo zelene mrlje predstavljaju izomere DAP, od kojih LL izomer putuje brže, dok se su ružičaste mrlje aminokiseline koje putuju brže od DAP izomera.

### 3.22. Pripremanje *E. coli* DH5 $\alpha$ i bakterija roda *Bacillus* za dugoročno čuvanje

Sojevi *E. coli* DH5 $\alpha$  koji su transformisani, kao i bakterije roda *Bacillus* izolovane iz zemljišta, pripremljeni su za dugoročno čuvanje u 20% glicerolu (0,8 ml prekonoćne kulture i 0,2 ml 100% glicerola) na -20°C ili -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.23. Pripremanje streptomiceta za dugoročno čuvanje

Petri šolja sa sporulisanim bakterijskim sojem prelivana je sa 9 ml sterilne destilovane vode a potom je micelijum izgreban ezom. Mililitar suspenzije je centrifugiran 15 minuta na 4 000 obrt/min, a potom je talog rastvoren u 4 ml sterilne vode i 1 ml glicerola (finalno 20% glicerol). Po mililitar suspenzije je sipan u sterilne 1,5 ml epruvete i uskladišten na -20°C (ili -80°C).

### 3.24. Sekvenciranje

Izolovani plazmidi (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) iz odabranih klonova iz metagenomskih biblioteka sekvencirani su na aparatu Applied Biosystems ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA; Servizio di Sequenciamente di DNA del C.R.I.B.-Universita di Padova). Rekombinantni plazmidi

koji sadrže 16S rDNK, PH, CAT120 ili CAT230 inserte sekvencirani su na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA; IMGGI), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, USA), po sledećoj proceduri:

Reakciona smeša za sekvenciranje, ukupne zapremine od 8  $\mu$ l sadržala je: 3  $\mu$ l Ready Reaction Mix-a, 3,2 pmol M13 prajmera (Yanish-Perron *et al.*, 1985) i 150-300 ng plazmida (DNK matrice). Prvi korak sekvenciranja urađen je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, USA ) korišćenjem sledećeg programa: (1) jedan ciklus inicijalne denaturacije u trajanju od 1 minuta na 96°C, (2) 25 ciklusa denaturacije na 96°C u trajanju od 10 sekundi, anilinga prajmera na 55°C od 5 sekundi i elongacija produkata u trajanju od 4 minuta na 60°C.

Produkti su prečišćavani, odnosno nevezani obeleženi nukleotidi su uklanjani dodavanjem 40  $\mu$ l rastvora A (1,2 ml 3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 5,2; 25 ml etanola; 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta na 13 000 obrt/min. Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran sa 200  $\mu$ l 70% etanola, centrifugiran 10 minuta na 13 000 obrt/min. Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponovljen je još jednom. Talog je osušen i rastvoren u 25  $\mu$ l HiDi formamida.

Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer.

### 3.25. Bioinformatička obrada sekvenci

Sekvence su sklopljene u SeqMan programu (DNASTAR, USA), a njihovi homolozi identifikovani su upotrebom BLAST algoritma (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Za 16S rDNK sekvence iz metagenomskih biblioteka i 16S rDNK sekvence bakterija sa sposobnošću razgradnje fenola identifikovani su i preuzeti homolozi sa RDP (Ribosomal Database Project II Release 9.4, <http://rdp.cme.msu.edu>; Cole *et al.*, 2009). 16S rDNK sekvence fenol razgrađujućih bakterija poravnate su sa homologim sekvencama u CLUSTALW programu (Thompson *et al.*, 1994). Filogenetska analiza i konstrukcija filogenetskih stabala urađena je u „neighbor-joining“ programu (NJ; Saitou i Nei, 1987) sadržanom u PHYLIP paketu (<http://bioweb2.pasteur.fr>; Felsenstein, 1993). Evaluacija topologije filogenetskih stabala urađena je „bootstrap“ metodom uz 100 ponavljanja (Felsenstein, 1985).

Sekvence fragmenata gena za enzime koji učestvuju u putevima razgradnje fenola pored BLASTN analize, podvrgnute su nakon prevođenja u proteinsku sekvencu i BLASTP analizi kako bi se utvrdila sličnost sa već postojećim proteinskim sekvencama.



### 3.26. Pripremanje ćelijskog lizata

Bakterije su gajene u 200 ml BS medijum (pH 7,2) suplementiranog sa 400 mg/ml fenola na 30°C. Posle 4 dana talog je oboren centrifugiranjem na 6 000 obrt/min (15 minuta, 4°C, GSA rotor, Sorvall, USA). Talog je potom ispiran rastvaranjem u 50 mM fosfatnom puferu ( $K_2HPO_4:KH_2PO_4$ , pH 7,2) i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta (6 000 obrt/min, 4°C). Supernatant dobijen posle ispiranja bakterijskog taloga i medijum dobijen posle obaranja ćelija korišćeni su za testiranje ekstraćelijske aktivnosti enzima.

Talog je potom rastvoren u 20 ml pufera za liziranje (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol pH 8 i 1 mg/ml lizozima) i inkubiran 30 minuta na ledu. Ćelijski lizat je dobijen posle sonifikacije (6 pulseva od 15 Hz u trajanju od 20 sekundi, sa pauzama od 20 sekundi) i 15 minuta centrifugiranja na 14 000 obrt/min na 4°C (Eppendorf microfuge; Eppendorf, Germany). Koncentracije proteina u sve tri frakcije određivane su po Bradford-u (1976; poglavlje 3.30.).

### 3.27. Enzimski eseji

Kinetika enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola, fenol hidroksilaze, katehol 1,2 i katehol 2,3–dioksigenaze određivane su po prethodno opisanim metodama (Ornston i Stanier, 1966; Neujahr i Gaal, 1975; Mars *et al.*, 1997).

*Fenol hidroksilaza:* Oksidacija NADH (eng. Nikotinamide Adenine Dinukleotide) je praćena na 340 nm u prisustvu fenola. Reakciona smeša sadržala je 50 mM fosfatni pufer (pH 7,2), 1 mM NADH, 100 nM fenol i uzorak (Neujahr i Gaal, 1975). Specifična aktivnost enzima dobija se deljenjem apsorbance sa koncentracijom proteina u uzorku. Jedan U enzima definiše se kao količina enzima koja katalizuje oksidaciju 1 mM supstrata (u ovom slučaju NADH) u jednom minutu.

*Katehol 2,3-dioksigenaza:* Reakciona smeša sadržala je 50 mM fosfatni pufer i 1 mM katehol. Pojava specifičnog produkta otvaranja kateholnog prstena, 2–hidroksimukonskog semialdehida, praćena je na 375 nm (Mars *et al.*, 1997). Jedan U enzima je količina enzima koja katalizuje stvaranje 1 mM semialdehida za jedan minut reakcije.

*Katehol 1,2-dioksigenaza:* Uslovi reakcije su identični kao za CAT23O, sa razlikom što se ovde prati stvaranje *cis,cis*-mukonske kiseline na 260 nm (Ornston i Stanier, 1966).

### 3.28. Određivanje temperaturnog i pH optimuma enzima

Kako bi se odredio pH optimum enzima u enzimskim esejima korišćeni su sledeći puferi: 50 mM natrijum acetatni pufer ( $\text{CH}_3\text{COONa}:\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 3,6 i 4,6), 50 mM fosfatni pufer ( $\text{K}_2\text{HPO}_4:\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,8 i 6,8), 50 mM Tris-HCl (pH 7,8 i 8,8) i 50 mM karbonatni/bikarbonatni pufer ( $\text{Na}_2\text{CO}_3:\text{NaHCO}_3$ , pH 9,4 i 10,8). Optimalna pH vrednost je određivana merenjem aktivnosti enzima (PH, C12O, and C23O) na 30°C (poglavlje 3.27.).

Temperaturni optimum određivan je praćenjem enzimске aktivnosti na različitim temperaturama od 10°C do 80°C u 50 mM fosfatnom puferu (pH 7,2).

### 3.29. Određivanje Michaelis-ove konstante i brzine enzimске reakcije

Kinetički parametri enzimске reakcije su određivani merenjem aktivnost enzima kao što je opisano u poglavlju 3.27., pri različitim koncentracijama supstrata. Kinetički parametri ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) dobijeni su fitovanjem eksperimentalnih podataka (specifične aktivnosti enzima) nelinearnom metodom najmanjih kvadrata u Lineweaver - Burk grafiku (1) koji je izveden iz Michaelis – Menten-ove jednačine (2) (Voet i Voet, 1995).

Lineweaver – Burk jednačina: 
$$1/v_0 = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

Michaelis – Menten-ova jednačina: 
$$v_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

$K_m$  je Michaelis-ova konstanta (M),  $V_{\max}$  maksimalna brzina reakcije (U/min) i  $[S]$  koncentracija supstrata (M).

### 3.30. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradford-u (1976), koja se zasniva na upotrebi bojenog reagensa tj. kiselog rastvora boje CBB G-250 (BioRad Protein Assay, BioRad Laboratories, USA). Za određivanje koncentracije proteina u 0,8 ml rastvora proteina nepoznate koncentracije dodato je 0,2 ml bojenog reagensa. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi merena je apsorbancija na 595 nm naspram slepe probe. Na osnovu standardne krive, koja predstavlja odnos između koncentracija poznatog proteinskog standarda (*eng.* Bovin Serum Albumine, BSA) i apsorbancije bojene reakcije na 595 nm, od izmerenih  $A_{595\text{nm}}$  vrednosti metodom ekstrapolacije dobijene su koncentracije proteina.

## IV REZULTATI

Rizosfere endemoreliktnih biljaka *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* predstavljaju izuzetno interesantno stanište za proučavanje diverziteta bakterija, s obzirom na veliku količinu fenolnih jedinjenja koje ove biljke sintetišu i izlučuju.

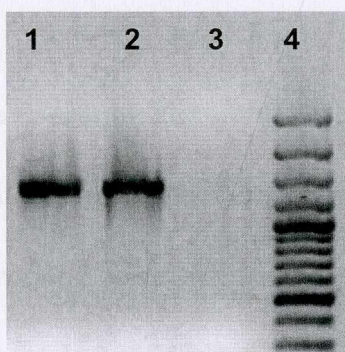
### 4.1. Metagenomski pristup analizi bakterijskog diverziteta

#### 4.1.1. Izolacija metagenomske DNK iz zemljišta

Metagenomska DNK izolovana je iz uzoraka rizosfernog zemljišta *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* metodom po Saano-u i Lindstrom-u (poglavlje 3.9.). Ovako dobijena DNK nije bila dovoljno čista da bi se koristila kao matrica u reakcijama amplifikacije (PCR), pa je prečišćavana prvo fenol hloroform metodom (poglavlje 3.11.), a potom elektroelucijom (poglavlje 3.12.). Kvalitet izolovane i prečišćene DNK proveravan je na 0,7% agaroznom gelu.

## 4.1.2. Umnožavanje gena za 16S ribozomalnu RNK iz metagenomske DNK

Prečišćena metagenomska DNK oba uzorka (iz rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae*) poslužila je kao matrica za PCR amplifikaciju gena za 16S rRNK (16S rDNK) bakterija. Odabrani su prajmeri iz visoko konzerviranih oblasti gena za 16S rRNK kod bakterija - 27f (Lane, 1993) i 1389r (Marchesi *et al.*, 1998), kojima se umnožava sekvenca dužine od 1362 bp. Uzorci razdvojeni na agaroznom gelu prikazani su na Slici 4.1.



Slika 4.1. Agarozna gel elektroforeza umnoženih delova gena za 16S rRNK.

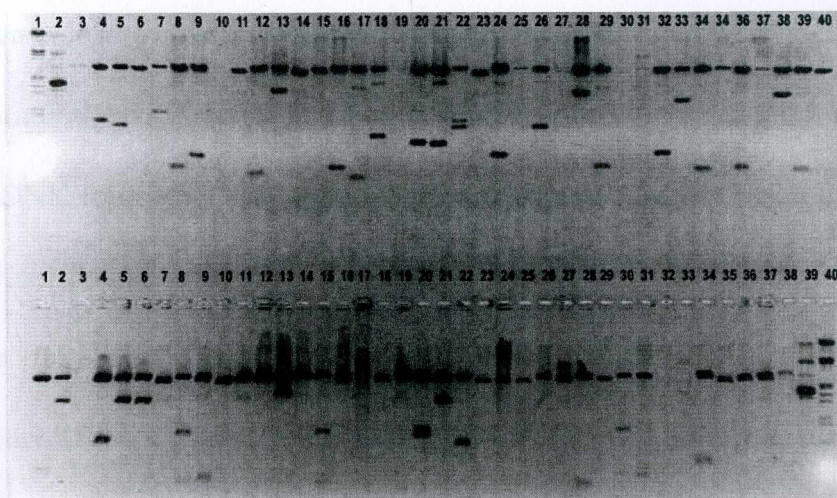
1. Produkt PCR reakcije (16S rDNK) sa DNK matrice izolovane iz rizosfere *R. serbica*;
2. Produkt PCR reakcije (16S rDNK) sa DNK matrice izolovane iz rizosfere *R. nathaliae*;
3. Kontrolna PCR reakcija bez DNK;
4. Standard molekulskih veličina – O'GeneRuler™ 100 bp DNK marker.

---

#### 4.1.3. Konstrukcija 16S rDNK biblioteka sredinskih klonova iz rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae*

Bibliotke 16S rDNK iz rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae* konstruisane su kao što je to ranije opisano (Đokić, 2004). Naime, produkti PCR amplifikacije, za oba uzorka posebno, ligirani su sa *Sma*I linearizovanim pUC19 vektorom. Kompetentne *E. coli* DH5 $\alpha$  ćelije transformisane su ligacionim smešama. Transformisane ćelije zasejavane su na LA podloge sa ampicilinom u finalnoj koncentraciji od 100  $\mu$ g/ml, pri čemu je dodavan i X-gal (0,4%) radi plavo-bele selekcije, tj. praćenja aktivnosti enzima  $\beta$ -galaktozidaze, kao indikatora uspešnog kloniranja inserta. Kloniranjem 16S rDNK iz uzorka rizosfere *R. nathaliae* dobijene su 192 bele kolonije, odnosno 80 belih kolonija kloniranjem 16S rDNK iz uzorka rizosfere *R. serbica*. Digestijom enzimima *Eco*RI i *Hind*III (Slika 4.2.) potvrđeno je da 106 klonova (nazvanih pUN, N od *nathaliae*) iz metagenoma *R. nathaliae* i 50 konova (nazvanih pUS, gde je S od *serbica*) iz metagenoma *R. serbica* poseduje insert odgovarajuće dužine, pa su oni dalje analizirani.





Slika 4.2. Elektroforetska pokretljivost pUN i pUS sredinskih klonova sečenih *EcoRI/HindIII* enzimima.

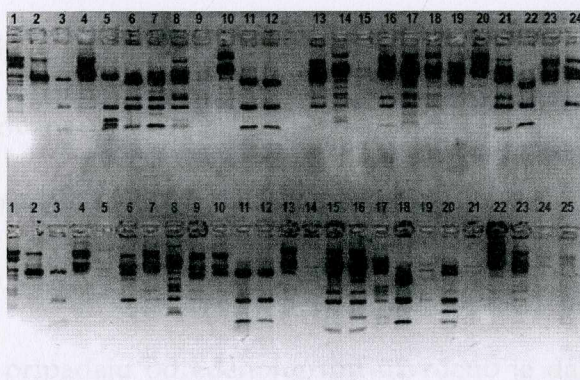
Gornji red: 1. Standard molekularnih veličina -  $\lambda$ DNKx*EcoRI/HindIII*; 2. pUC19; 3. pUC19 sečen *EcoRI/HindIII*; 4. do 25. - pUN klonovi sečeni *EcoRI/HindIII*. Donji red: 1. do 15. - pUS klonovi sečeni *EcoRI/HindIII*; 16. do 37. - pUN klonovi sečeni *EcoRI/HindIII*; 38. pUC19 sečen *EcoRI/HindIII*; 39. pUC19; 40. Standard molekularnih veličina -  $\lambda$ DNKx*EcoRI/HindIII*.

#### 4.1.4. ARDRA/RFLP analiza biblioteka sredinskih 16S rDNK klonova

Nakon primarne restriktione analize sredinskih klonova enzimima *EcoRI/HindIII* rađena je i ARDRA/RFLP analiza (eng. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/Restriction Fragment Length Polymorphism). Ova metoda podrazumeva



analizu klonova tj. inserata restrikcionim enzimima koji češće seku DNK i grupisanje klonova u operative taksonomske jedinice (OTJ), koje čine klonovi sa istim profilom pokretljivosti DNK fragmenata na agaroznom gelu. Klonovi iz sredinske biblioteke rizosfere *R. serbica* svrstani su u 13 OTJ, a klonovi iz rizosfere *R. nathaliae* u 35 OTJ na osnovu profila traka na 2% agaroznom gelu (deo klonova sečenih enzimom *RsaI* je prikazan na Slici 4.3., a OTJ profili na Slici 4.4.b). Svaka OTJ je sadržala najmanje jedan klon sa specifičnim profilom pokretljivosti na gelu.

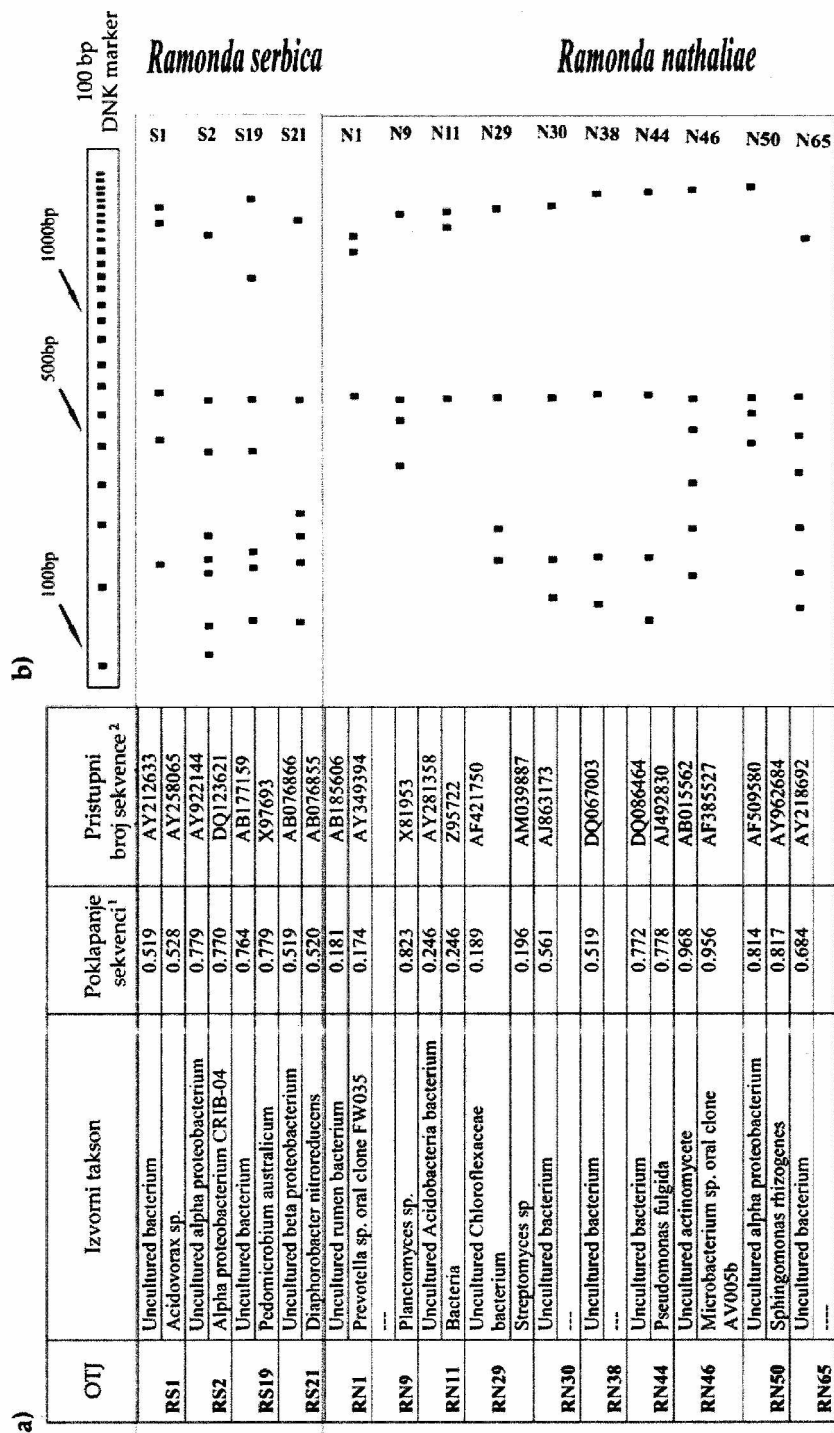


Slika 4.3. Elektroforetska pokretljivost pUN i pUS sredinskih klonova sečenih *RsaI* enzimom.

Gornji red: 1. Standard molekularnih veličina -  $\lambda$ DNKx*EcoRI*/*HindIII*; 2. pUC19; 3. pUC19 sečen *RsaI* enzimom; 4. do 13. - pUN klonovi sečeni *RsaI* enzimom; 14. do 24. - pUS klonovi sečeni *RsaI* enzimom. Donji red: 1. Standard molekularnih veličina -  $\lambda$ DNKx*EcoRI*/*HindIII*; 2. pUC19; 3. pUC19 sečen enzimom *RsaI*; 4. do 25. - deo pUN klonova sečenih *RsaI* enzimom.

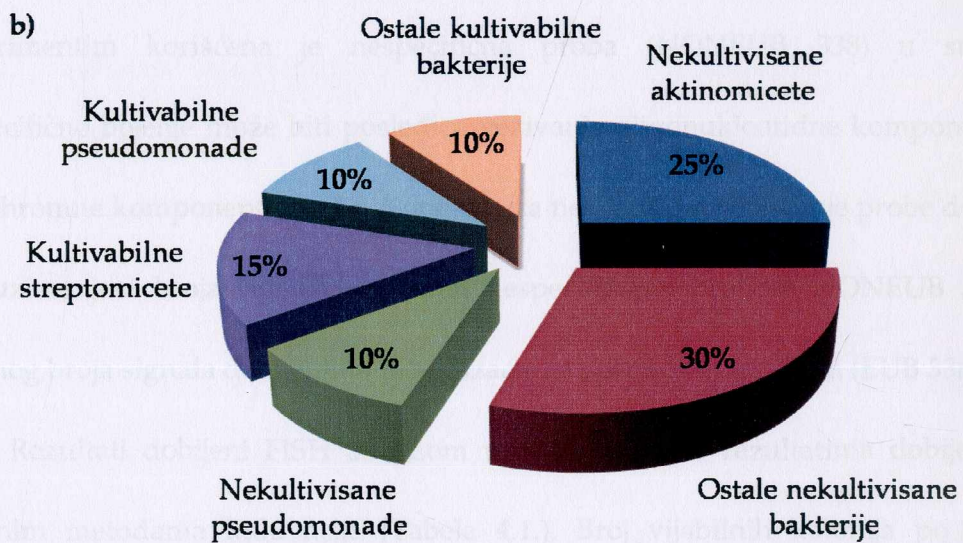
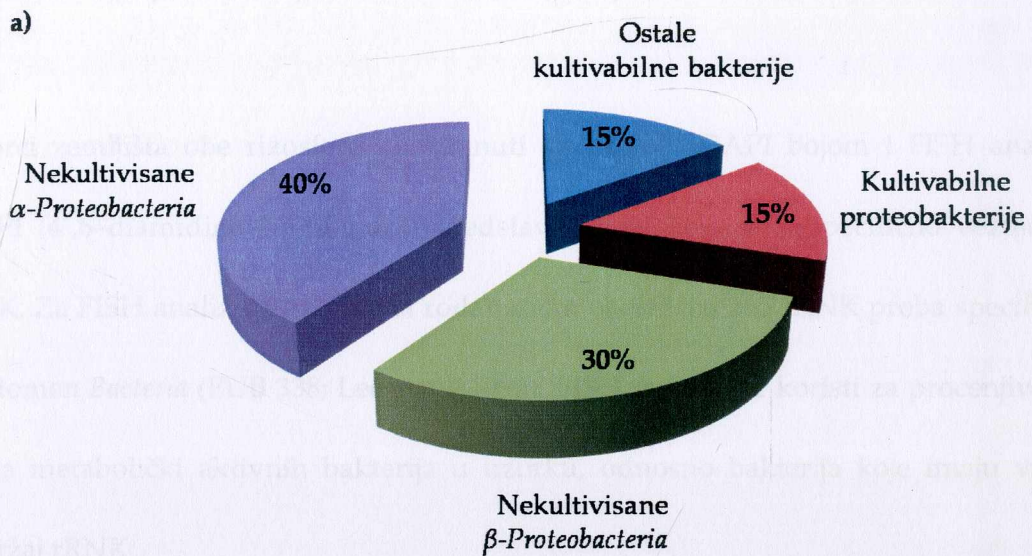
#### 4.1.5. Sekvenciranje i analiza sekvenci sredinskih klonova

U zavisnosti od veličine OTJ, donosno od broja klonova koji je čine, sekvencirani su po jedan do tri reprezentativna klona iz svake OTJ. Sekvence su sastavljene u SeqMan programu, a njihovi homolozi identifikovani upotrebom BLAST algoritma (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Himerne sekvence i sekvence koje nisu mogle biti svrstane u okviru trenutno poznatih bakterijskih grupa isključene su iz daljih analiza. Ovakvom analizom pokazano je da u sredinskoj biblioteci *R. serbica* postoji samo 4, dok u sredinskoj biblioteci *R. nathaliae* postoji 10 različitih OTJ. Sekvence su deponovane u NCBI bazu podataka, a pristupni brojevi sekvenci su DQ398928 – DQ398940. Analiza sekvenci pokazala je da najveći broj bakterija u ovim rizosferama pripada do sada nekultivisanim bakterijama (Slika 4.4.a). Upoređivanjem broja sekvenci koje pripadaju određenoj grupi utvrđeno je da u rizosferi *R. serbica* 40% bakterija pripada grupi nekultivisanih  $\alpha$ -*Proteobacteria*, a oko 30% nekultivisanim  $\beta$ -*Proteobacteria*. Najzastupljenije, sa 15%, među bakterijama koje se mogu kultivisati, su takođe proteobakterije (Slika 4.5.a). Više od polovine bakterija u rizosferi *R. nathaliae* pripada nekultivisanim bakterijama, i to 25% aktinomicetama, 10% acidobakterijama i oko 30% drugim nekultivisanim bakterijama. Među bakterijama koje mogu da se kultivišu najzastupljenije su streptomicete (oko 15%) i pseudomonade (oko 10%) (Slika 4.5.b).



Slika 4.4. Analiza biblioteka 16S rDNK sredinskih klonova poreklom od metagenomskih DNK izolovanih iz rizosfera *R. serbica* and *R. nathaliae*. a) Sličnost sekvenci reprezentativnih klonova sa sekvencama iz RDP baze podataka; b) Shematski prikaz OTJ profila dobijenih sečenjem klonova *RsaI* enzimom.<sup>1</sup> - verovatnoća; <sup>2</sup> - NCBI baza podataka.





Slika 4.5. Zastupljenost pojedinih bakterijskih grupa u bibliotekama 16S rDNK sredinskih klonova. a) Zastupljenost bakterija u 16S rDNK biblioteci iz rizosfere *R. serbica*; b) Zastupljenost bakterija u 16S rDNK biblioteci iz rizosferi *R. nathaliae*.

#### 4.2. DAPI bojenje i fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH)

Uzorci zemljišta obe rizosfere podvrgnuti su bojenju DAPI bojom i FISH analizi. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) predstavlja boju koja se nespecifično vezuje za DNK. Za FISH analizu je korišćena rodaminom obeležena 16S rRNK proba specifična za domen *Bacteria* (EUB 338; Lee *et al.*, 1999). FISH metoda se koristi za procenjivanje broja metabolički aktivnih bakterija u uzorku, odnosno bakterija koje imaju visok sadržaj rRNK.

Kako bi se izvršila korekcija nespecifičnog bojenja, u kontrolnim eksperimentim korišćena je nespecifična proba (NONEUB 338) u suvišku. Nespecifično bojenje može biti posledica vezivanja oligonukleotidne komponente ili fluorohromne komponente probe. Korekcija za nespecifično vezivanje probe dobijena je oduzimanjem broja signala dobijenih nespecifičnom probom NONEUB 338 od ukupnog broja signala dobijenih u hibridizaciji sa specifičnom probom (EUB 338).

Rezultati dobijeni FISH analizom upoređeni su sa rezultatima dobijenim u klasičnim metodama kultivacije (Tabela 4.1.). Broj vijabilnih kolonija po gramu zemljišta (CFU/g) na kome raste *R. serbica* je 1000 puta manji od metabolički aktivnih bakterija dobijenih FISH analizom, dok je taj odnos u rizosfernom zemljištu *R. nathaliae* oko 100. I ovaj rezultat potvrđuju prethodno iznetu činjenicu da se samo mali broj bakterija može izolovati tradicionalnim metodama kultivacije.



Rezultati FISH analize upoređeni su sa rezultatima dobijenim DAPI bojenjem i pokazano je da metabolički aktivne bakterije predstavljaju mali deo ukupnog broja bakterija u uzorku, svega oko 5%.

Tabela 4.1. Broj vijabilnih bakterija po gramu ispitivanog zemljišta određen FISH metodom i tradicionalnim brojanjem kolonija na Petri šolji.

Rizofera	CFU/g zemljišta	Broj bakterija/g zemljišta (FISH)
<i>Ramonda serbica</i>	$9,6 \times 10^5$	$2 \times 10^9$
<i>Ramonda nathaliae</i>	$1.86 \times 10^6$	$9 \times 10^8$

#### 4.3. Izolacija bakterija sa sposobnošću razgradnje fenola

Sadržaj fenolnih jedinjenja u testiranim organima *R. serbica* je povećan, pa je samim tim i koncentracija fenola u rizosferi velika (Sgherri *et al.*, 2004). S obzirom da je fenol jako toksičan za većinu živih organizama, bakterije koje nastanjuju rizosfere *R. serbica* i *R. nathaliae* moraju biti adaptirane na visoku koncentraciju fenola tako što ga tolerišu ili pak imaju sposobnost njegove razgradnje.

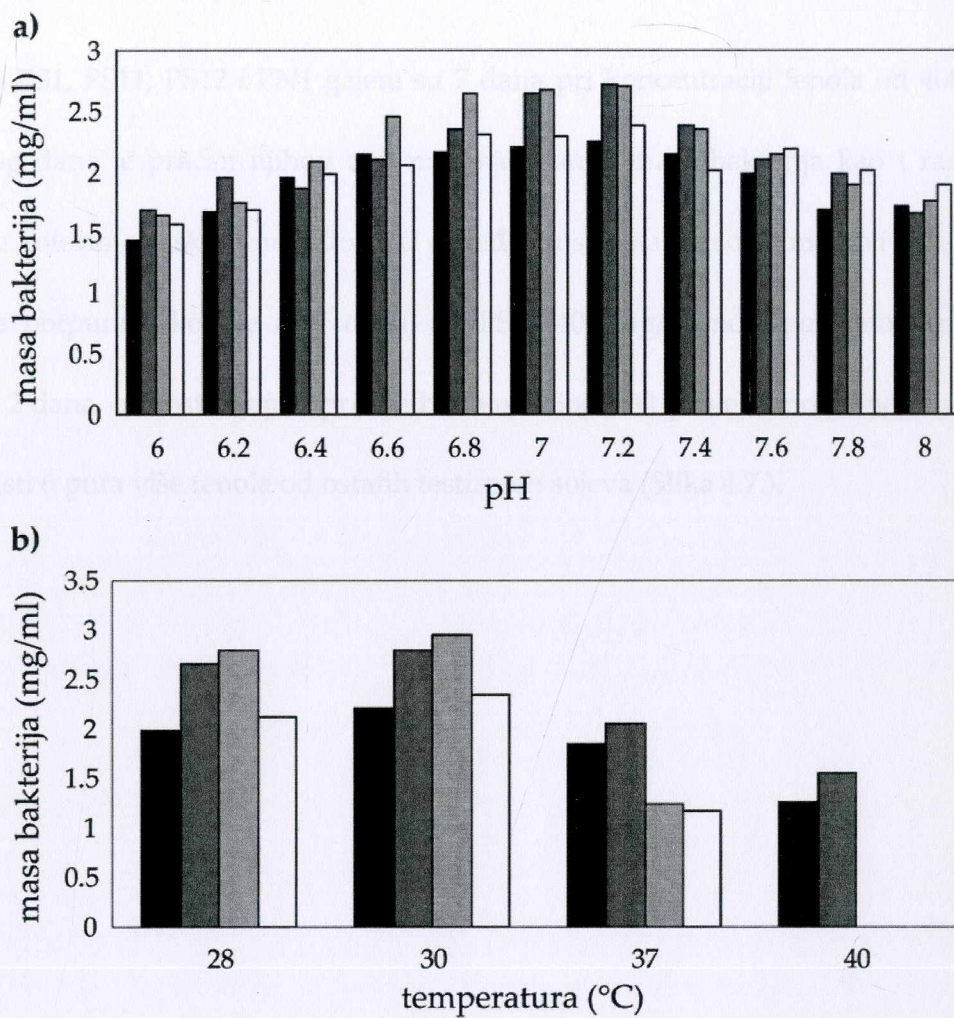


Metodom predobogaćivanja (pretretmana) zemljišta fenolom u koncentraciji od 1,5% iz zemljišnog uzorka *R. serbica* izolovano je 13 bakterija tolerantnih na fenol, koje su obeležene od PS1 do PS13 (gde je P od engleskog phenol i S od *serbica*). Posle istog tretmana iz zemljišta *R. nathaliae* izolovano je 10 bakterija tolerantnih na fenol. One su obeležene od PN1 do PN10 (P od engleskog phenol i N od *nathaliae*).

Izolovane bakterije tolerantne na fenol gajene su u minimalnom medijumu (BS) sa dodatkom fenola u koncentraciji od 400 mg/l kako bi se selektovale bakterije koje poseduju sposobnost razgradnje fenola, tj. rastu na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika. Četiri bakterijska soja, PS1, PS11, PS12 i PN1 rasla su u ovakvim uslovima, te se smatraju bakterijama koje razgrađuju fenol.

Utvrđeni su i optimalni uslovi za rast bakterija na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika gajenjem bakterija u BS medijumu sa različitim pH i na različitim temperaturama (poglavlje 3.7.1). U daljim eksperimentima bakterije su gajene na optimalnim uslovima za rast, tj. na 30°C u medijumu sa pH vrednošću od 7.2 (Slika 4.6.).

Sojevi koji razgrađuju fenol su gajeni u minimalnom medijumu suplementiranom fenolom u koncentracijama od 200 do 2000 mg/l. Svi testirani sojevi rasli su čak i pri najvišim koncentracijama fenola.

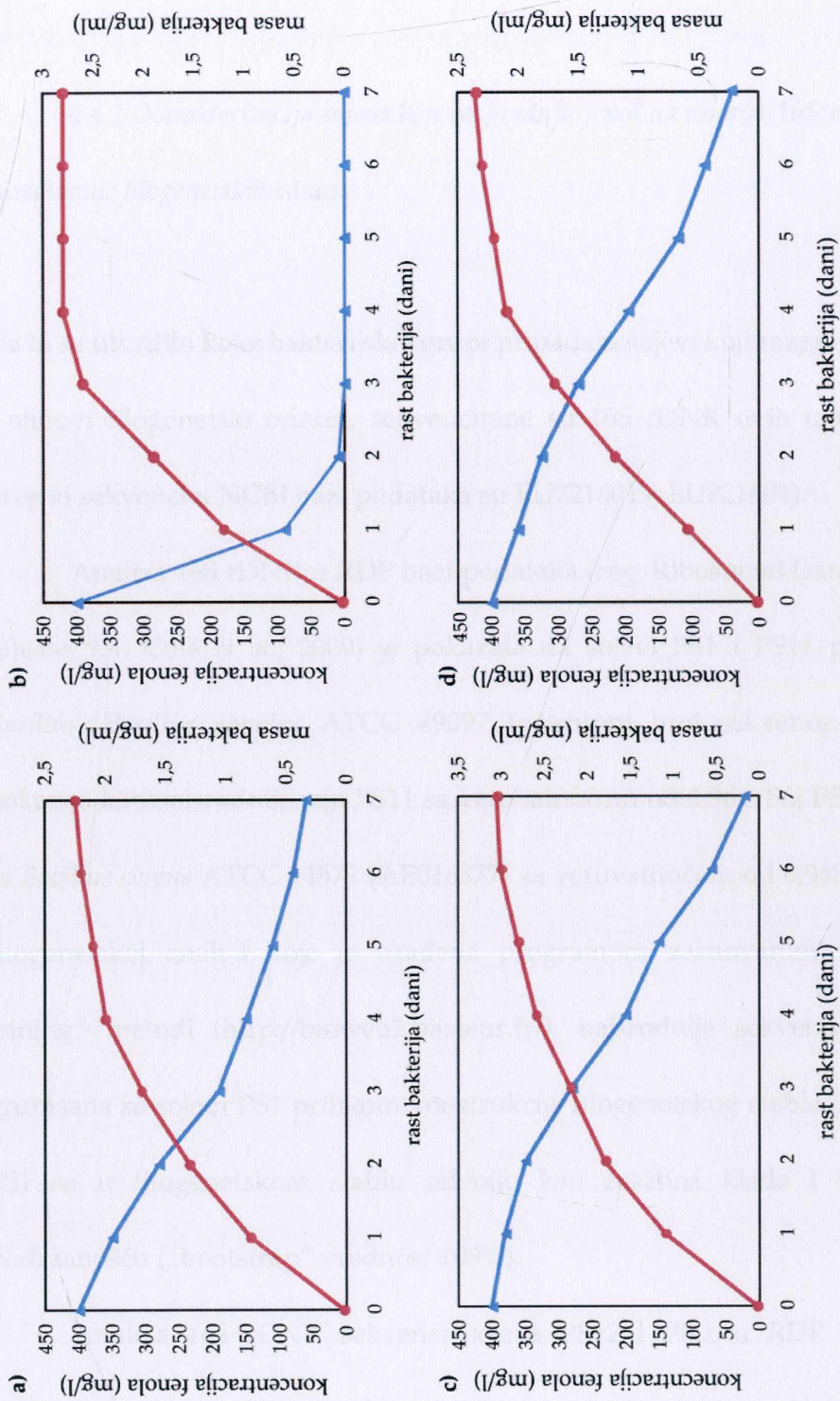


4.6. Temperaturni i pH optimum za rast sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1 na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika. a) Rast sojeva na različitim pH medijuma; b) Rast sojeva na različitim temperaturama. Soj PS1 je predstavljen crnim stubićem, soj PS11 tamno sivim, soj PS12 svetlo sivim, i soj PN1 belim.

#### 4.3.1. Stopa rasta i profil razgradnje fenola

Sojevi PS1, PS11, PS12 i PN1 gajeni su 7 dana pri koncentraciji fenola od 400 mg/l, i svakog dana je praćen njihov rast merenjem suve mase bakterija kao i razgradnja fenola kolorimetrijskom metodom. U poređenju sa ostalim sojevima koji ovu količinu fenola potpuno iskoriste za 7 dana, soj PS11 400 mg/l fenola potpuno razgradi za samo 2 dana, udvostručujući pritom biomasu. Soj PS11 posle samo jednog dana rasta iskoristi 6 puta više fenola od ostalih testiranih sojeva (Slika 4.7.).





Slika 4.7. Grafički prikaz stope rasta i profila razgradnje fenola. a) Soj PSI; b) Soj PS11; c) Soj PS12; d) Soj PN1. Crvenom

krivom je predstavljen rast bakterija, a plavom razgradnja fenola.

#### 4.4. Karakterizacija sojeva koji razgrađuju fenol

##### 4.4.1. Karakterizacija sojeva koji razgrađuju fenol na osnovu 16S rDNK sekvence i određivanje filogenetskih odnosa

Da bi se utvrdilo kojoj bakterijskoj grupi pripadaju sojevi koji razgrađuju fenol, kao i njihovi filogenetski odnosi, sekvencirane su 16S rDNK ovih izolata (pristupni brojevi sekvenci u NCBI bazi podataka su EU721601 – EU721604).

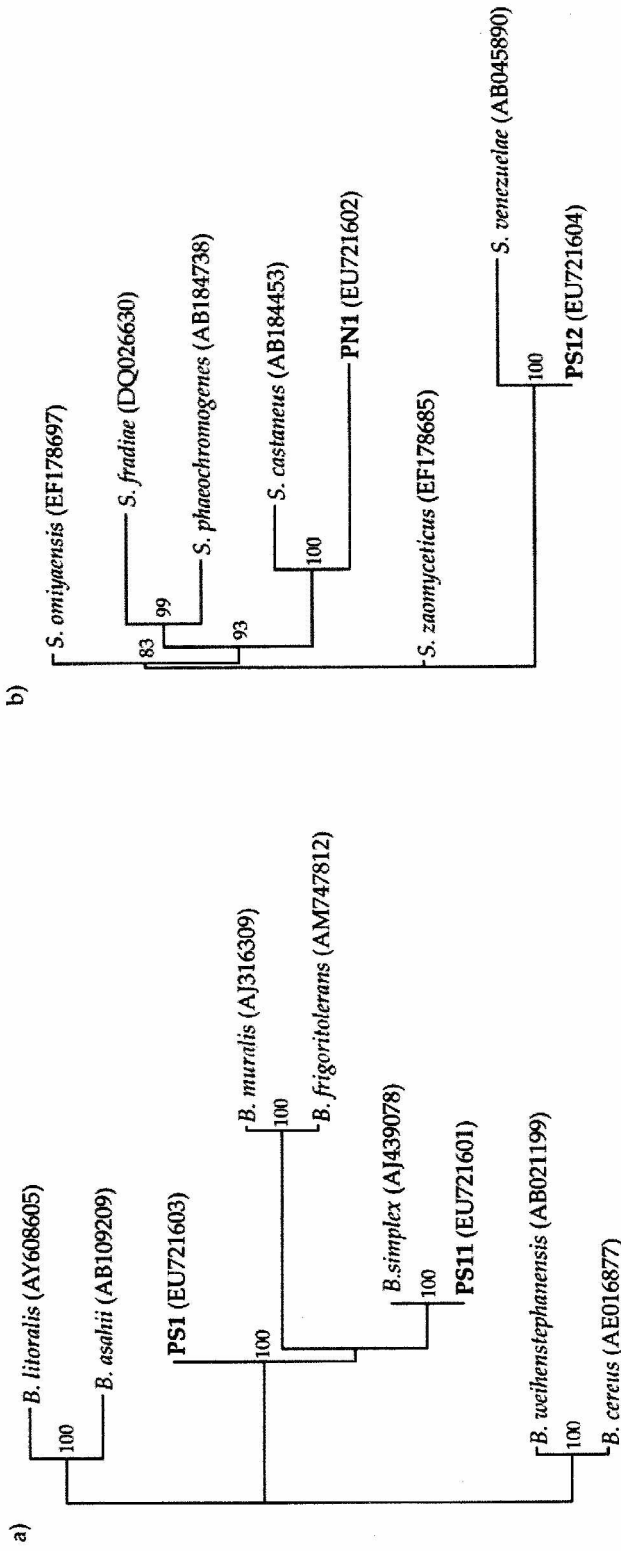
Analiza 16S rDNK u RDP bazi podataka (*eng.* Ribosomal Database Project II release 9.4; Cole *et al.*, 2009) je pokazala da sojevi PS1 i PS11 pripadaju rodu *Bacillus*. *Bacillus simplex* ATCC 49097 (pristupni broj sekvence: AJ439078) se pokazao kao najrodniji soju PS11 sa verovatnoćom od 0,964. Soj PS1 je najrodniji sa *Bacillus cereus* ATCC 14579 (AE016877) sa verovatnoćom od 0,948. Međutim, po filogenetskoj analizi koje je urađena programom zasnovanim na „neighbor-joining“ metodi (<http://bioweb2.pasteur.fr/>), najrodnija sekvenca iz RDP nije grupisana sa sojem PS1 prilikom konstrukcije filogenetskog stabla (Slika 4.8.a). Soj PS1 se u filogenetskom stablu odvojio kao zasebna klada i to sa velikom podržanošću („bootstrap“ vrednost 100%).

Analiza 16S rDNK sekvenci sojeva PS12 i PN1 u RDP bazi podataka pokazala je njihovu filogenetsku pripadnost rodu *Streptomyces*. Najveću sličnost sa

sojem PS12, i to sa verovatnoćom od 0,966 pokazao je *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 (AB045890). *Streptomyces zaomyceticus* ATCC 27482 (EF178685) je sa verovatnoćom od 0,812 najrodniji soju PN1. Prilikom rekonstrukcije filogenetskog stabla soj PS12 je formirao monofiletsku kladu sa *S. venezuelae* ATCC 10712 (AB045890) podržanu visokom *bootstrap* vrednošću od 100%, dok je PN1 formirao nezavisnu liniju odvojenu od njegovog najbližeg srodnika *S. zaomyceticus* ATCC 27482 (EF178685) (Slika 4.8.b).

Soj PS11 je najveću sličnost pokazao sa *B. simplex*, a PS12 sa *S. venezuelae*. Kako za *B. simplex* i *S. venezuelae* ne postoje podaci da poseduju sposobnost razgradnje fenola, moglo bi se pretpostaviti da je soj PS11 ustvari *B. simplex*, donosno da je soj PS12 ustvari soj *S. venezuelae*, ali su horizontalnim genskim transferom pokupili plazmid sa enzimima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola.

Zanimljivo je da su analizirani izolati najveći stepen srodnosti pokazali sa bacilusima i streptomicetama, koji inače ne spadaju u grupu najčešće izolovanih bakterija koje razgrađuju fenol. Među svim tipskim sojevima koji su pokazali najveću sličnost sa PS1, PS11, PS12 i PN1 sojevima, i koji su korišćeni u filogenetskoj analizi i rekonstrukciji filogenetskog stabla, samo za soj *Bacillus weihenstephanensis* ATCC 21832 je pokazano da može razgrađivati fenol (Adav *et al.*, 2007).



Slika 4.8. Filogenetska stabla sojeva koji razgrađuju fenol dobijena na osnovu 16S rDNK sekvenci. a) Filogenetsko stablo sojeva PS1 i PS11; b) Filogenetsko stablo sojeva PS12 i PN1. Konstrukcija filogenetskih stabala je urađena „neighbour-joining“ metodom (Saitou i Nei,1987), dok je podržanost filogenetskih odnosa dobijena „bootstrap“metodom (Felsenstein, 1985) uz 100 ponavljanja.



## 4.4.2. Biohemijske i fiziološke osobina sojeva koji razgrađuju fenol

Fenotipske, odnosno biohemijske i fiziološke osobine sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1 sumirane su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Karakteristike sojeva koji razgrađuju fenol.

Karakteristika	PS1	PS11	PS12	PN1	Karakteristika	PS1	PS11	PS12	PN1
Rast na izvoru ugljenika (1% w/v):					Rast na izvoru azota (0.1% w/v):				
Ksiloz	-	+	-	-	L-alanin	+	-	+	-
Inulin	-	-	-	-	L-arginin	-	+	-	+
Indol	-	+	-	-	L-asparagin	+	+	+	+
Salicin	-	-	+	+	L-cistin	-	-	+	-
Arabinoza	-	+	-	-	L-histidin	-	-	-	+
Rafinoza	-	-	-	-	L-lizin	+	+	+	-
D(+)-Manitol	+	+	+	+	L-triptofan	-	-	+	+
Redukcija nitrata	+	+	+	-	L-valin	-	-	+	+
Prisustvo enzima:					Razgradnja:				
Katalaza	+	+	+	+	Kazeina	+	+	+	+
Želatinaza	-	-	+	-	Eskulina	-	+	+	-
DNaza	-	-	-	+	Lecitina	-	+	+	-
Citohrom C oksidaza	+	+	+	+	Citrata	-	+	-	+
Lipaza	-	-	-	-	Uree	+	+	-	-
Produkcija H <sub>2</sub> S	+	-	-	-	β Hemoliza	+	+	+	+
Rast na +4°C	+	+	+	+	Rast na 45°C	-	+	-	-
Rezistancija na antibiotike (μg/ml):					Rezistancija na antibiotike (μg/ml):				
Ampicilin	100	100	100	100	Gentamicin	-	50	10	-
Kanamycin	-	100	-	-	Apramicin	-	100	-	-
Tetraciklin	-	10	50	-	Hloramfenikol	-	-	30	-



Ni jedan od testiranih sojeva ne koristi sorbitol, dulcitol, mezo-inozitol, adonitol ili trehalozu kao izvor ugljenika, jer nisu pokazali rast u minimalnom medijumu suplementiranom ovim šećerima (1% w/v).

Testirani sojevi su acidorezistentni (bojenje po Ziehl-Neelsen-u) tj. sadrže više od 60% lipida u ćelijskom zidu i boje se ljubičasto po Gram-u (Gram-pozitivni).

Sojevi nisu pokazali antibiotsko delovanje na *Bacillus subtilis* NCMIB 3610, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aerations* ATCC 17853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Sarcina lutea* i *Candida albicans* CBS 562 (Materijal i metode, poglavlje 3.2). Takođe, ni jedan od testiranih sojeva ne proizvodi bioaktivna jedinjenja sa imunosupresorskim delovanjem, što je testirano na senzitivnom soju kvasca *Saccharomyces cerevisiae* FAV20.

Zbog filogenetske sličnosti 16S rDNK sojeva PS12 i PN1 sa streptomisetama, karakteristike njihovih micelijuma analizirane su po uputstvima „International Streptomyces Project-a“ (ISP). Boja supstratnog micelijuma na asparagin agaru (ISP5) posle 14 dana inkubacije na 30°C bila je svetlo maslinasto zelena za oba soja (PS12 and PN1). Nije primećen nikakav difuzni pigment na ovom medijumu. Tamno žuti micelijum soja PS12 i svetlo zeleni micelijum soja PN1 primećeni su prilikom gajenja sojeva na agaru sa skrobom i neorganiskim solima (ISP4). Oba izolata proizvela su melanin na agaru sa peptonom, ekstraktom kvasca i gvožđem (ISP6) i agaru sa tirozinom (ISP7).

#### 4.5. Dodatne analize sa soj PN1

S obzirom da soj PN1 na osnovu sekvence 16S rDNK pripada grupi streptomiceta, koje se retko izoluju kao bakterije sa sposobnošću razgradnje fenola i da se u filogenetskoj analizi (Slika 4.8.b) izdvojio od svog najbližeg srodnika *S. zaomyceticus* ATCC 27482 (EF178685), pretpostavljeno je da je PN1 najverovatnije novi soj i podvrgnut je daljim analizama.

##### 4.5.1. Tačka topljenja DNK i GC sastav

GC sastav DNK molekula soja PN1 određen je na osnovu hiperhromnog efekta, merenjem rasta apsorbanca na talasnoj dužini od 260 nm. Na osnovu dobijenih vrednosti  $A_{260}$  nm određena je tačka topljenja ( $T_m$ ) koja je iznosila oko 98°C. Na osnovu vrednosti  $T_m$  preračunat je i GC sastav. Utvrđeno je da DNK soja PN1 ima visok GC sastav, oko 70%, što je i jedna od karakteristika streptomiceta, kojima ovaj soj pripada na osnovu anlike sekvence 16S rDNK.

#### 4.5.2. Tankoslojna hromatografija (eng. *Tin Layer Chromatography, TLC*)

Metodom tankoslojne hromatografije određen je i izomer diaminopimelinske kiseline (DAP), koji ulazi u sastav peptidoglikana u ćelijskom zidu soja PN1. Uzorci, koji predstavljaju specifično pripremljen ćelijski zid, upoređivani su sa standardom DL-DAP (mezo- i LL-DAP) što je pokazalo da kod soja PN1 u sastav peptidoglikana ulazi LL izomer diaminopimelinske kiseline, koji je i najzastupljeniji kod streptomiceta.

#### 4.6. Enzimi koji učestvuju u razgradnji fenola kod sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1

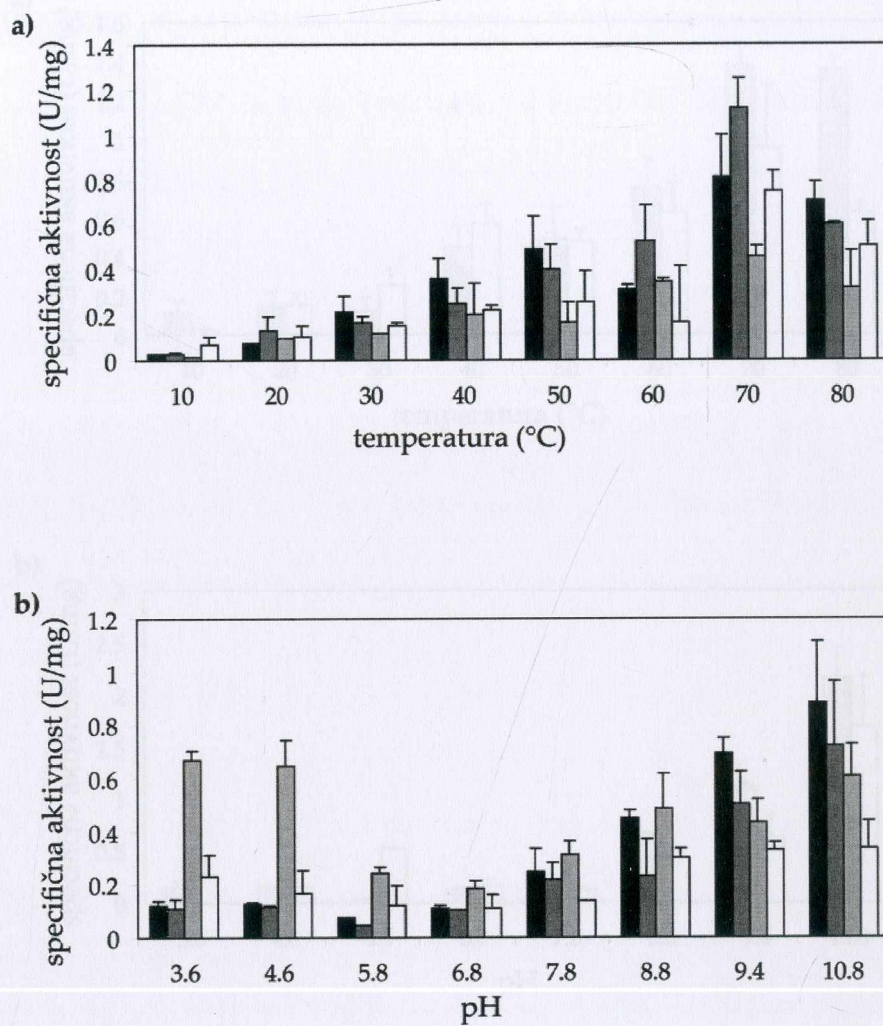
##### 4.6.1. Putevi razgradnje fenola i optimalni uslovi za rad enzima koji učestvuju u putevima razgradnje

Aerobne bakterije najčešće razgrađuju fenol u *orto* ili *meta* putu. Fenol hidroksilaza (PH), koja prevodi fenol u katehol, je zajednički enzim za oba puta. Kateholni prsten može biti otvoren intradiolno, enzimom katehol 1,2–dioksigenazom (*orto* put) ili ekstradiolno, enzimom katehol 2,3–dioksigenazom (*meta* put) (Slika 1.3.).

Praćenjem produkata koji nastaju u enzimskim reakcijama moguće je utvrditi koji je put razgradnje prisutan kod određenog bakterijskog soja. U enzimskim esejima je pokazano da svi testirani sojevi poseduju enzim fenol hidroksilazu (detektovana

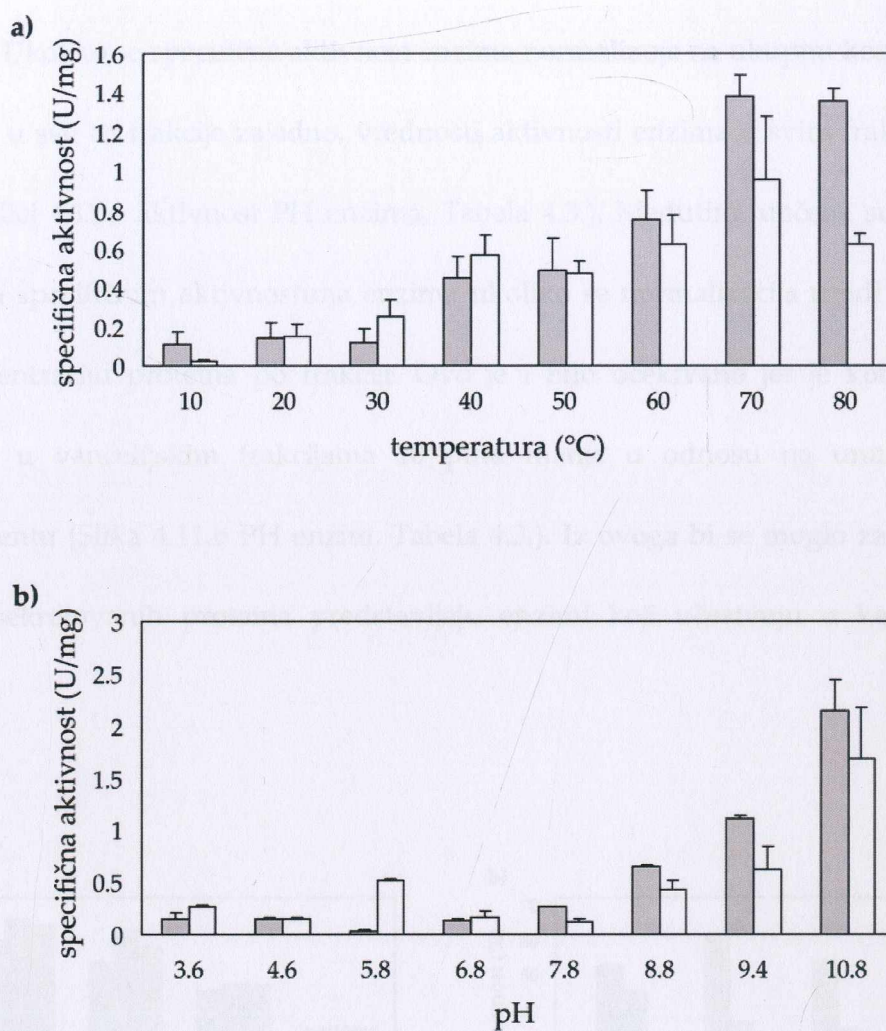
aktivnost) i katehol 1,2–dioksigenazu (C12O), dok sojevi PS11 i PN1 imaju i enzim katehol 2,3–dioksigenazu (C23O). Samim tim svi sojevi fenol razgrađuju u *orto* putu, dok PS11 i PN1 koriste i *meta* put razgradnje fenola. Ovo je jedan od retkih slučajeva da bakterije imaju oba puta razgradnje fenola.

Određivani su i optimalni uslovi za rad enzima pri čemu je uočen porast aktivnosti enzima sa porastom temperature. Maksimum aktivnosti za sva tri enzima (PH, C12O i C23O) je na temperaturi od 70°C (Slike 4.9.a i 4.10.a), što je daleko iznad optimalne temperature za rast testiranih bakterija. Optimalna pH vrednost za rad PH enzima je od 7.8, dok je za C12O (Slika 4.9.b) i C23O (Slika 4.10.b) pokazano da je optimalna pH vrednost 10.6.



Slika 4.9. Temperaturni i pH optimum enzima katehol 1,2–dioksigenaze iz sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1. a) Temperaturni optimum C12O enzima; b) pH optimum C12O enzima. Soj PS1 je predstavljen crnim stubićem, soj PS11 tamno sivim, soj PS12 svetlo sivim i soj PN1 belim.



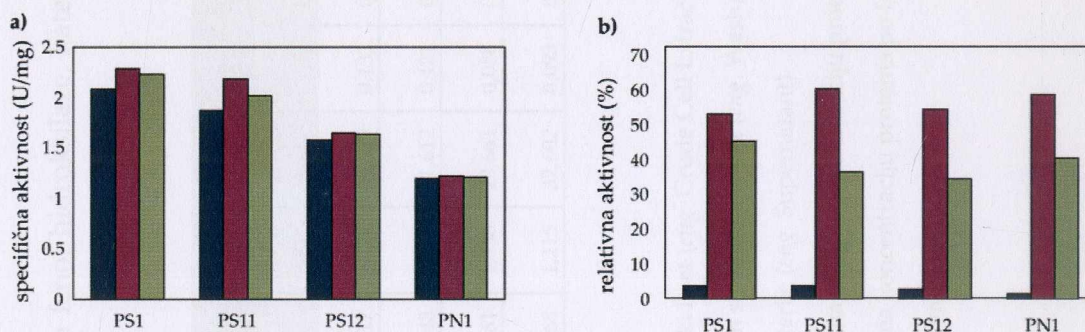


Slika 4.10. Temperaturni i pH optimum enzima katehol 2,3–dioksigenaze iz sojeva PS12 i PN1. a) Temperaturni optimum C23O enzima; b) pH optimum C23O enzima. Soj PS12 je predstavljen svetlo sivim stubićem, a soj PN1 belim.

Aktivnost enzima je testirana kako u unutarćelijskoj frakciji (ćelijskom lizatu), tako i u ekstraćelijskim frakcijama (supernatant i pufer kojim su ispirane ćelije), kako



bi se utvrdilo da li je enzim pretežno unutarćelijski i/ili se izlučuje u spoljašnju sredinu. Ukoliko se specifična aktivnost enzima normalizuje na ukupnu koncentraciju proteina u sve tri frakcije zajedno, vrednosti aktivnosti enzima u svim frakcijama su slične (Slici 4.11.a aktivnost PH enzima, Tabela 4.3.). Međutim, uočene su značajne razlike u specifičnim aktivnostima enzima ukoliko se normalizacija uradi u odnosu na koncentraciju proteina po frakciji. Ovo je i bilo očekivano jer je koncentracija proteina u vanćelijskim frakcijama 10 puta manja u odnosu na unutarćelijsku komponentu (Slika 4.11.b PH enzim, Tabela 4.3.). Iz ovoga bi se moglo zaključiti da većinu sekretovanih proteina predstavljaju enzimi koji učestvuju u katabolizmu fenola.



Slika 4.11. Aktivnosti PH enzima u zavisnosti od normalizacije. a) Normalizacija aktivnosti enzima na totalnu koncentraciju proteina; b) Normalizacija aktivnosti enzima na koncentraciju proteina po frakciji. Plavi stubić predstavlja aktivnost PH enzima u ćelijskom ekstraktu, bordo u medijumu, a zeleni u puferu kojim su ispirane ćelije.



Tabela 4.3. Aktivnost enzima fenol hidroksilaze, katehol 1,2–dioksidogenaze i katehol 2,3–dioksidogenaze u unutarćelijskoj i vanćelijskim frakcijama.

	PH aktivnost (U/mg)						C12O aktivnost (U/mg)						C23O aktivnost (U/mg)					
	CCE <sup>1</sup>	CCE <sup>2</sup>	W <sup>1</sup>	W <sup>2</sup>	SN <sup>1</sup>	SN <sup>2</sup>	CCE <sup>1</sup>	CCE <sup>2</sup>	W <sup>1</sup>	W <sup>2</sup>	SN <sup>1</sup>	SN <sup>2</sup>	CCE <sup>1</sup>	CCE <sup>2</sup>	W <sup>1</sup>	W <sup>2</sup>	SN <sup>1</sup>	SN <sup>2</sup>
<b>PS1</b>	2,081	2,439	2,282	33,417	2,227	28,329	0,131	0,154	0,172	2,522	0,131	1,672						
<b>PS11</b>	1,875	2,218	2,185	35,548	2,021	21,612	0,121	0,143	0,142	2,309	0,119	1,279	0,107	0,126	0,142	2,309	0,119	1,279
<b>PS12</b>	1,578	1,779	1,645	37,461	1,636	23,661	0,088	0,099	0,092	2,097	0,095	1,385						
<b>PN1</b>	1,205	1,286	1,224	47,468	1,215	32,602	0,093	0,099	0,105	4,072	0,063	1,685	0,063	0,065	0,071	2,758	0,069	1,864

CCE – unutarćelijska frakcija, ćelijski lizat (*eng.* Crude Cell Extract)

W – vanćelijska frakcija, pufer kojim su ispirane ćelije (*eng.* Wash)

SN – medijum u kome su rasle bakterije (*eng.* Supernatant)

<sup>1</sup> – normalizacija aktivnosti enzima na ukupnu koncentraciju proteina u sve tri frakcije

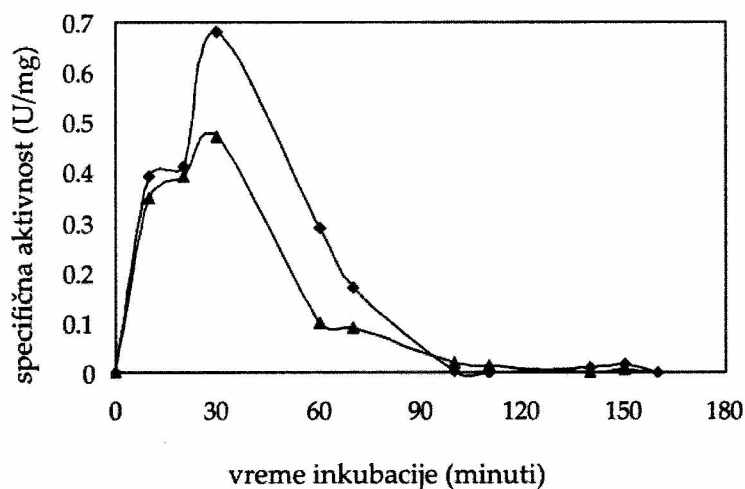
<sup>2</sup> – normalizacija aktivnosti enzima na koncentraciju proteina po frakciji

Prazna polja – nije detektovana aktivnost enzima

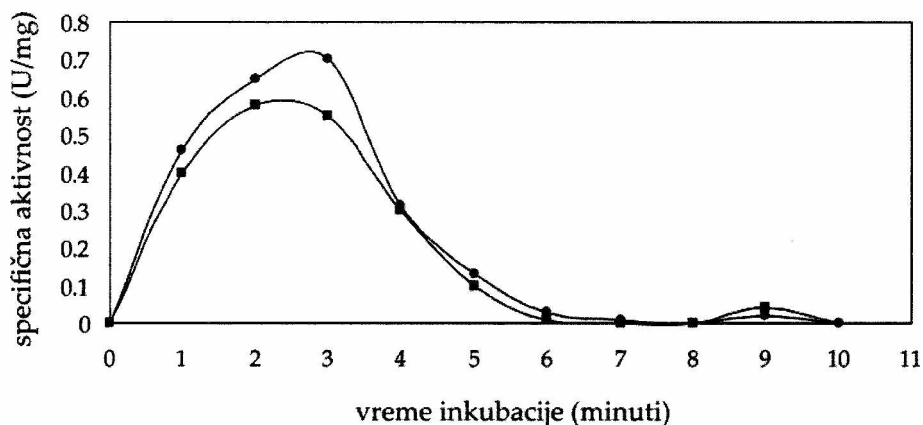


## 4.6.2. Kinetika enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola

Aktivnost enzima PH u ćelijskom ekstraktu bakterija gajenih u optimalnim uslovima za rast određivana je spektrofotometrijski, praćenjem oksidacije NADH na 340 nm. Maksimalnu aktivnost PH enzim iz sojeva PS11 i PN1 od 0,7 U/mg, odnosno 0,6 U/mg postiže 15 puta brže u donosu na PH enzim iz sojeva PS1 i PN12, čija je maksimalna specifična aktivnost 0,68 U/mg, odnosno 0,45 U/mg (Slike 4.12. i 4.13.).

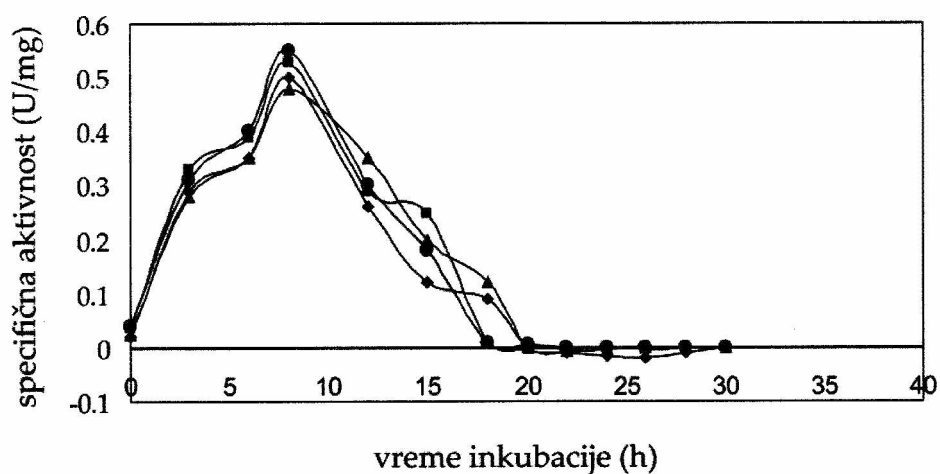


Slika 4.12. Specifična aktivnosti fenol hidrosilaze iz sojeva PS1 i PS12 u zavisnosti od vremena inkubacije. Soj PS1 je predstavljen simbolom ◆, a soj PS12 simbolom ▲.

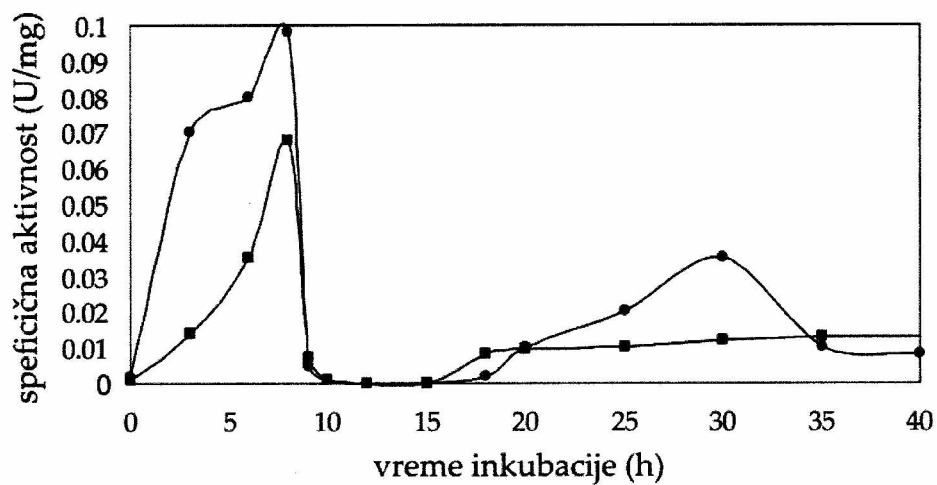


Slika 4.13. Specifična aktivnosti enzima fenol hidroksilaze iz sojeva PS11 i PN1 u zavisnosti od vremena inkubacije. Soj PS11 je predstavljen simbolom ●, a soy PN1 simbolom ■.

Aktivnost C12O enzima praćena je spektrofotometrijski (260 nm), merenjem formiranja *cis, cis*-mukonske kiseline kao produkta razgradnje katehola. Ovaj enzim kod svih sojeva, maksimum specifične aktivnosti postiže u osmom satu reakcije, a vrednosti se kreću u rasponu od 4,5 do 5,5 U/mg (Slika 4.14.). Aktivnost enzima C23O praćena je preko nastajanja 2-hidroksimukonskog semialdehida (spektrofotometrijski na 375 nm), produkta otvaranja kateholnog prstena ovim enzimom. Maksimalna aktivnost C23O enzima kod sojeva PS11 i PN1 od 0,1 U/mg, odnosno 0,065 U/mg postiže se takođe u osmom satu reakcije (Slika 4.15.).



Slika 4.14. Specifična aktivnost enzima katehol 1,2–dioksigenaze u zavisnosti od vremena inkubacije. Soj PS1 je predstavljen simbolom ◆, PS11 simbolom ●, PS12 ▲, a PN1 simbolom ■.



Slika 4.15. Specifične aktivnosti enzima katehol 2,3–dioksigenaze u zavisnosti od vremena inkubacije. Soj PS11 je predstavljen simbolom ●, a PN1 ■.

## 4.6.3. Kinetički parametri enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola

Kinetički parametri enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola određivani su praćenjem aktivnosti enzima u prisustvu različitih koncentracija supstrata. Vrednosti parametara enzimske reakcije, izračunati na osnovu Michaelis – Menten-ove jednačine prikazani su u tabeli 4.4. Enzim koji ima najbolje kinetičke karakteristike je fenol hidrosilaza iz svih testiranih sojeva.

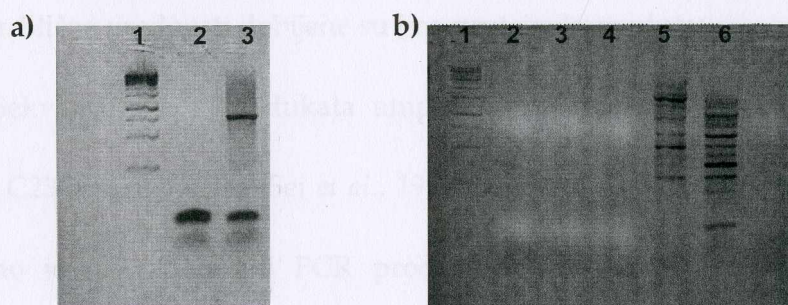
Tabela 4.4. Kinetički parametri enzima fenol hidrosilaze (PH), katehol 1,2–dioksigenaze (C12O) i katehol 2,3–dioksigenaze (C23O).

Enzim	Kinetički parametri	PS1	PS11	PS12	PN1
PH	Km (nM)	56,4	51,2	54,3	51,8
	Vmax (U/min)	0,0186	0,022	0,018	0,021
C12O	Km (nM)	2600	1700	2500	3100
	Vmax (U/min)	0,00238	0,0039	0,0028	0,00295
C23O	Km (nM)	-	4500	-	3800
	Vmax (U/min)	-	0,0027	-	0,00264



## 4.6.4. Molekularno-genetička analiza puteva razgradnje fenola

Delovi gena koji kodiraju enzime PH, C12O i C23O su umnoženi za sva četiri ispitivana soja, a produkti PCR reakcija su analizirani agaroznom gel elektroforezom (Slika 4.16.a i b). S obzirom da su bili očekivanih veličina, fragmenti su klonirani u pUC19 vektor. Na osnovu restrikcione analize odabrani su klonovi koji su sadržali inserte odgovarajućih veličina i dalje analizirani.



Slika 4.16. Agarozna gel elektroforeza umnoženih fragmenata gena koji kodiraju enzime PH, C12O i C23O. a) Umnoženi fragmenti gena za PH; b) Umnoženi fragmenti gena za C23O. a) 1. Marker molekulskih veličina - 100 bp O'Range Ruler™; 2. Kontrolna PCR reakcija bez DNK; 3. Umnoženi fragment PH gena iz soja PN1. b) 1. marker molekulskih veličina - 100 bp O'Range Ruler; 2. Kontrolna PCR reakcija bez DNK; 3. PCR na DNK soja PS1; 4. PCR na DNK soja PS12; 5. PCR na DNK soja PS11; 6. PCR na DNK soja PN1.

Umnoženi konzervirani region PH gena je sekvenciran (pristupni brojevi sekvenci HM021729 – HM021732) i DNK sekvenca je prevedena u proteinsku sekvencu. Obe sekvence, i DNK i proteinska, su analizirane upotrebom BLAST algoritma (Altschul *et al.*, 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) kako bi se pronašli homolozi među već deponovanim sekvencama. PH gen iz sojeva PS1 i PS11 pokazao je najveću sličnost sa genom za ovaj enzim iz *Rhodococcus erythropolis* sa identičnošću od 98% za PS1, odnosno 99% za PS11. Ovaj gen iz sojeva PS12 i PN1 identičnost od 78%, odnosno 79% pokazuje sa deponovanim PH genima iz bakterije *Nocardia farcinica*. Slične vrednosti dobijene su i na proteinskom nivou.

Sekvenciranjem produkata amplifikacije dobijenih upotrebom prajmera za C120 i C230 iz literature (Sei *et al.*, 1999; An *et al.*, 2001) i pretraživanjem GenBank utvrđeno je da uklonirani PCR produkti nisu homologi sa do sada poznatim sekvencama za ove gene. Dodatnim pretraživanjem literature pronađeni su drugi prajmeri za C120 kod Gram-pozitivnih bakterija, dok su za C230 dizajnirani degenerisani prajmeri na osnovu postojećih sekveni gena za ove enzime kod Gram-pozitivnih bakterija. Međutim, ni upotrebom ovih prajmera nisu amplifikovani delovi gena za enzime C120 i C230.



## V DISKUSIJA

### 5.1. Metagenomski pristup analizi mikrobiološkog diverziteta rizosfera *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae*

Razumevanje diverziteta bakterija je od praktičnog značaja, jer bakterije sačinjavaju najveći deo biološkog diverziteta Zemlje i učestvuju u važnim procesima u ekosistemu. Mikroorganizmi imaju veliki uticaj kako na neorgansku tako i na organsku komponentu zemljišta i aktivno oblikuju zemljišni matriks formiranjem i restrukturiranjem komponenti koje ga sačinjavaju (Preston, 2001). Procenjeno je da diverzitet prokariota u zemljištu može dostići i milion vrsta po gramu, što daleko prevazilazi broj vrsta procenjenih na osnovu klasičnih studija zasnovanih na kultivaciji mikroorganizama (Gans *et al.*, 2005).

Diverzitet mikroorganizama se sastoji od dve komponente: broja vrsta (bogatstva) i zastupljenosti vrsta. Najveći diverzitet javlja se u zajednicama koje imaju veliki broj vrsta koje su podjednako zastupljene (Huston, 1994). Bogatstvo i zastupljenost vrsta u zajednici odslikavaju selektivan pritisak koji oblikuje diverzitet unutar zajednica. Merenje ovih parametara je izuzetno korisno kada je potrebno utvrditi uticaj zagađenje, dodavanje nutrijenata, promena klimatskih uslova na diverzitet zajednica.

Iako su zajednice zemljišnih mikroorganizama među najraznovrsnijim i najkompleksnijim u biosferi, veoma malo se zna o vrstama koje ulaze u njihov sastav. Utvrđeno je da većina mikroorganizama iz prirodnog okruženja ne može biti kultivisana u standardnim laboratorijskim uslovima, odnosno da oko 99% mikroorganizama iz zemljišta ostaje neidentifikovano (Torsvik *et al.*, 2002).

Razvijanje novih metoda za direktnu izolaciju ukupne DNK iz zemljišta omogućilo je dobijanje DNK i onih mikroorganizama koje je nemoguće gajiti u današnjim laboratorijski uslovima.

*Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae* su endemorliktne biljke, koje se odlikuju specifičnim životnim ciklusom, velikom produkcijom fenola i povećanom koncentracijom fenola u rizosferama (Sgherri *et al.*, 2004). Da bi se utvrdio diverzitet mikroorganizama u rizosferama *R. serbica* i *R. nathaliae*, izolovana je metagenomska DNK iz zemljišta dvema metodama. Kako na uspešnost izolacije DNK iz zemljišta utiču mnogi faktori bitno je probati više metoda za izolaciju DNK. Metoda koja je podrazumevala upotrebu staklenih kuglica za razbijanje ćelijskog zida bakterija dala je dobar prinos, ali je dobijena DNK bila delimično degradovana i nije mogla da se koristi kao matrica za umnožavanje 16S rRNK gena (Đokić, 2004). Bolje rezultate dala je metoda po Saano-u i Lindstom-u (Materijal i metode, poglavlje 3.9.) jer je dobijena DNK bila zadovoljavajućeg kvaliteta, te je korišćena kao matrica za umnožavanjem gena za 16S RNK, pri čemu je dobijen produkt odgovarajuće dužine (Slika 4.1.).

Reakcija lančanog umnožavanja (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) dela gena za 16S rRNK (16S rDNK) iz metagenomske DNK može biti izvor grešaka. Nekoliko studija je pokazalo da značajnu frakciju 16S rDNK predstavljaju interspecijski himerni molekuli, koji nastaju kao posledica umnožavanja gena iz metagenomske DNK koja predstavlja mešavinu različitih genoma (Wang i Wang, 1996). S druge strane, kako većina bakterija ima više kopija rRNK gena, čije sekvence mogu biti heterogene (mogu se razlikovati i do 6,5%), tokom PCR-a mogu se formirati himerni molekuli i između različitih kopija rRNK gena istog organizma, tzv. intraspecijski himerni molekuli (Clayton *et al.*, 1995; Wang i Wang, 1997). Himerni molekuli nastaju tako što se sintetisana DNK u jednom ciklusu PCR-a vezuje za homologu sekvencu u DNK matrici i postaje prajmer za sledeći ciklus umnožavanja. Nastali molekul je himera sa jednim krajem poreklom od jednog organizma ili od jedne kopije 16S rRNK gena, dok je drugi kraj poreklom od drugog organizma, odnosno druge kopije gena. Neisključivanjem himernih molekula iz analize dolazi do hiperprodukcije vrsta, odnosno identifikacije nepostojećeg organizma. Verovatnoća nastanka himernih molekula može se umanjiti smanjenjem broja ciklusa i povećanjem vremena trajanja elongacije u PCR-u. Nakon sekvenciranja dobijenih 16S rDNK fragmenata i njihovog upoređivanja sa već poznatim sekvencama različitih organizama, moguće je identifikovati himerne DNK molekule i isključiti ih iz daljih analiza. Takođe, u novije vreme razvijeni su i programi koji prepoznaju himerne

sekvence (Huber *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2005) čijom se upotrebom znatno olakšava analiza i skraćuje vremene njenog trajanja.

Pored himernih molekula tokom PCR-a moguće je stvaranje heterodupleksa i pojava mutacija. Kada se kao matrica za PCR amplifikaciju koristi ukupna sredinska (metagenomska) DNK, gotovo je nemoguće izbeći formiranje heterodupleksa između homologih sekvenci. Ako se ovakav molekul uklonira i njime transformišu ćelije, kao rezultat plazmidne propagacije nastaju dva homodupleksa 16S rDNK (Snyder i Champness, 1997). Restrikciona analiza ovih produkata/klonova daje izmenjene profile u ARDRA/RFLP analizi (*eng.* Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis/Restriction Fragment Length Polymorphism).

Mutacije nastale tokom PCR reakcije predstavljaju još jedan potencijalni problem. Naime, polimeraza tokom sinteze može da ugradi pogrešan nukleotid, i ukoliko se to desi na specifičnom mestu koje prepoznaje restrikcioni enzim menja se i ARDRA/RFLP profil. Mutacije tokom umnožavanja moguće je smanjiti upotrebom polimeraze koja ima veću efikasnost i tačnost, kao što je *Pfu* polimeraza (stopa mutacije je 1 pogrešno ugrađena baza na 1,3 miliona baza; Cline *et al.*, 1996).

Totalni broj PCR artefakata raste kako se diverzitet vrsta u uzorku povećava, jer sa porastom broja vrsta raste i verovatnoća nastanka interspecijskih himera kao i verovatnoća nastanka heterodupleksa između homologih sekvenci.

Nekoliko faktora može da utiče i na relativnu učestalost sekvenci u finalnom PCR uzorku. Jedan of faktora je i GC sastav DNK matrice, koji uzrokuje selektivno umnožavanje pojedinih gena. Visok GC sastav smanjuje efikasnost disocijacije lanaca DNK matrice, tako da matrice sa niskim GC sastavom, koje se brže denaturišu, mogu biti prekomerno zastupljene u populaciji jednolančanih molekula slobodnih za hibridizaciju sa prajmerima, rezultujući u preusmeravanju umnožavanja u njihovu korist. Zbog ovoga se preporučuje upotreba formamida ili DMSO-a (dimetil sulfoksida), jer ova jedinjenja smanjuju tačku topljenja i time omogućavaju efikasnije učestvovanje molekula DNK sa visokim GC sastavom u PCR reakciji (Reysenbach *et al.*, 1992).

Dodatni metodološki problem predstavlja kontaminacija PCR reakcije neželjenom DNK (npr. bakterijama iz vazduha), pa je eksperiment potrebno raditi u kontrolisanim uslovima.

Pored metodoloških problema i sama struktura bakterijskog genoma, kao što je njegova veličina i broj rRNK gena mogu biti izvor grešaka u analizi diverziteta. Veličina genoma i broj *rrn* operona variraju među prokariotskim vrstama. Veličina genoma može varirati između 0,6 i 13 Mb (Cole i Girons, 1994). Varira čak i broj hromozoma – npr. *Brucella meliensis* sadrži dva hromozoma od 2,1 i jedan od 1,15 Mb (Michaux *et al.*, 1993). Broj gena koji kodiraju 16S rRNK varira od 1 do 14, i u većini slučajeva geni su povezani u *rrn* operone čije su kopije locirane na istom hromozomu

(Cole i Girons, 1994). Geni za 16S rRNK koji se nalaze u više operona amplifikuju se većom frekvencijom u odnosu na one koji se nalaze u manjem broju operona, što dovodi i do njihove veće učestalosti u finalnom PCR uzorku.

Imajući u vidu sve moguće izvore grešaka i načine za njihovo uklanjanje ili svođenje na minimum, dizajniran je odgovarajući „Touchdown“ PCR program za umnožavanje dela gena za 16S rRNK iz uzorka metagenomskih DNK. S obzirom da je već poznato iz literature da se verovatnoća stvaranja himernih molekula u PCR reakciji od 30 ciklusa udvostručuje (Wang i Wang, 1996), u ovom radu je korišćen program od 25 ciklusa. Kako je u PCR-u koji ima 30 ciklusa sa vremenom elongacije od 2 minuta verovatnoća nastanka hamera 32% i da se verovatnoća smanjuje sa porastom vremena elongacije (Wang i Wang, 1997), korak elongacije u korišćenom PCR programu trajao je 2,5 minuta. Ove modifikacije su teoretski smanjile mogućnost nastanka himernih molekula.

Metagenomska DNK iz zemljišta predstavlja mešavinu različitih genoma, koji mogu biti različitog GC sastava. Kako tačka topljenja DNK raste sa porastom GC sastava, u PCR smešu je dodavan DMSO da bi se izbegla prekomerna zastupljenost matrica sa niskim GC sastavom u populaciji jednolančanih molekula. Takođe su na istom uzorku DNK urađene tri nezavisne PCR reakcije, kako bi se dodatno smanjila statistička zastupljenost čestih i/ili sekvenci sa niskim GC sastavom.



U reakciji lančanog umnožavanja korišćeni su prajmeri koji odgovaraju konzerviranom delu gena za 16S RNK male subjedinice ribozoma (Lane, 1991; Marchesi *et al.*, 1998) kojima se umnožava sekvenca dužine od 1362 bp. Produkti amplifikacije poslužili su za konstrukciju biblioteka 16S rDNK sredinskih klonova. Sredinska biblioteka 16S rDNK iz metagenoma rizosfere *R. nathaliae* sadržala je 192 bele kolonije, dok je 16S rDNK biblioteka iz metagenoma rizosfere *R. serbica* imala 80. U svakom koraku eksperimenta (PCR-u, ligaciji i transformaciji) je moglo doći do greške koja bi dovela do razlike u broju transformanata.

Pretpostavka je da su razlike u prinosu PCR produkata mogle nastati zbog razlike u kvalitetu i GC sastavu DNK matrica poreklom iz različitih uzoraka zemljišta, ili je možda i diverzitet bakterija u uzorku zemljišta rizosfere *R. serbica* znatno manji.

Dobijeni 16S rDNK klonovi podvrgnuti su ARDRA/RFLP analizi. Ovakva analiza podrazumeva sečenje klonova restrikcionim enzimima kako bi se na osnovu elektroforetske pokretljivosti otkrile razlike među kloniranim insertima. Analiza enzimima *EcoRI/HindIII* rađena je u cilju provere efikasnosti kloniranja tj. da li kod transformanata postoji insert odgovarajuće veličine. Ova inicijalna analiza je pokazala da biblioteka *R. nathaliae* ima samo 106 transformanata, a biblioteka *R. serbica* 50, dok su preostali plazmidi predstavljali samo religante pUC19 vektora.

Nakon inicijalne analize *EcoRI/HindIII* restrikcionim enzimima, analiza *RsaI* enzimom poslužila je za preciznije određivanje elektroforetskih profila i grupisanje klonova u operativne taksonomske jedinice (OTJ). Jednu OTJ čine klonovi koji pokazuju istu shemu elektroforetskih pokretljivosti restrikcionih fragmenata. Ova analiza pokazala je da u 16S rDNK biblioteci rizosfere *R. nathaliae* ima ukupno 35 operativnih taksonomskih jedinica. Biblioteka 16S rDNK sredinskih klonova iz rizosfere *R. serbica* sadržala je ukupno 13 OTJ.

Međutim, mora se imati u vidu da ovi podaci ne moraju biti apsolutno tačni, jer iako klonovi imaju iste elektroforetske profile ne moraju biti isti, kao što ni različiti elektroforetski profil ne znači obavezno i različite klonove. Naime, u zavisnosti od orijentacije u kojoj je ukloniran insert, 16S rDNK sekvenca koja potiče od jedne bakterijske vrste neće dati isti elektroforetski profil zbog izmenjenog topološkog rasporeda restrikcionih mesta. Dve bakterijske vrste imaće iste elektroforetske profile ukoliko im je raspored mesta koje prepoznaje određeni enzim isti, iako sekvence mogu pokazivati veći ili manji stepen heterogenosti.

Zato je sledeći korak u metagenomskoj analizi bakterijskog diverzitea sekvenciranje, jer se samo tako može utvrditi da li se različite OTJ sastoje od klonova koji sadrže 16S rDNK poreklom od različitih mikroorganizama. Kako neke operativne taksonomske jedinice imaju više članova, za što tačniju analizu iz ovakvih OTJ sekvencirano je više klonova. Homologe sekvence identifikovane su korišćenjem

BLAST algoritma (Altschul *et al.*, 1997). Na ovaj način su identifikovane i himerne sekvence, kako intraspecijske tako i interspecijske, koje su isključene iz daljih analiza. Sekvence koje nisu mogle biti svrstane u okviru trenutno poznatih bakterijskih grupa, kultivisanih ili nekultivisanih, takođe su isključene iz daljih analiza. Za pojedine klonove koji su imali različite RFLP profile, posle sekveniranja je pokazano da imaju iste inserte. Ovakvom analizom pokazalo se da u sredinskoj biblioteci *R. serbica* postoje samo 4 različite OTJ, dok u sredinskoj biblioteci *R. nathaliae* postoji 10 različitih OTJ (pristupni brojevi sekvenci DQ398928 – DQ398940; poglavlje Rezultati, Slika 4.4.). Najveći broj bakterija u ovim rizosferama predstavljaju do sada nekultivisane bakterije. U rizosferi *R. serbica* najveći broj bakterija pripada proteobakterijama, dok su najbrojnije bakterije u zemljištu *R. nathaliae* aktinomicete (poglavlje Rezultati, Slika 4.5.).

Na diverzitet bakterija u rizosferi utiče i sama biljka tj. njeni eksudati. Biljka koja raste, kroz korenov sistem izlučuje organska jedinjenja u rizosferu koja menjaju nutritivni status i hemijsku sastav zemljišta. Ova jedinjenja utiču na rast specifičnih populacija, ali smanjuju mikrobiološki diverzitet (Kowalchuk *et al.*, 2002; Smalla *et al.*, 2001).

Pokazano je da je koncentracija fenolnih jedinjenja u rizosferi *R. serbica* veća od koncentracije fenola u rizosferama drugih viših biljaka (Sgherri *et al.*, 2003), i da koncentracija fenolnih jedinjenja u samoj biljci varira zavisno od faze životnog

ciklusa. Naime, u prvoj fazi rehidracije koncentracija fenolnih jedinjenja je četiri puta veća nego kod potpuno dehidrirane biljke (Sgherri *et al*, 2004). Koncentracija fenolnih jedinjenja u rizosferama ovih endemoreliktnih biljaka sigurno je jedan od razloga za smanjeni diverzitet mikroorganizama. Zemljište korišćeno u ovom radu uzorkovano je u mesecu martu, kada su biljke bile potpuno hidratizane, ali ipak izložene stresu niske spoljašnje temperature. S obzirom da je sinteza fenolnih jedinjenja povećana u stresnim uslovima, pretpostavljeno je da je i koncentracija ovih jedinjenja u zemljištu bila povećana.

Drugo moguće objašnjenje smanjenog bakterijskog diverziteta je i nedostatak samih metoda izolacije i prečišćavanja DNK, zato što je za metagenomske analize neophodna nedegradovana DNK, a čak i same čestice zemljišta mogu dovesti do njenog oštećenja. Takođe, zemljišta sadrže humusnu kiselinu koja najčešće ostaje i nakon prečišćavanja DNK, i koja može u potpunosti blokirati PCR reakciju ili pak sprečiti amplifikaciju 16S rDNK pojedinih bakterijskih grupa.

Veoma je važno shvatiti da biblioteke koje se sastoje od PCR-om umnoženih 16S rRNK gena ne predstavljaju tačnu sliku bakterijske zajednice. Pre svega, sve do sada objavljene 16S rDNK sekvence čine veoma malu frakciju celokupnog bakterijskog diverziteta (Schloss i Handelsman, 2004). Takođe, može postojati i velika varijabilnost u zastupljenosti određenih 16S rDNK u zemljištu i sredinskim bibliotekama. Kako različiti mikroorganizmi imaju različitu sposobnost da budu

lizirani, 16S rDNK prisutne u izolovanoj DNK i bibliotekama zavise od metode koja je korišćena za izolaciju totalne DNK (Gabor *et al.*, 2003). Molekularnim tehnikama se najčešće identifikuju najzastupljenije bakterijske grupe (Prosser *et al.*, 2010). Gans i saradnici (2005) su pretpostavili da je potrebno sekvencirati  $10^6$  klonova kako bi se identifikovalo oko 80% vrsta prisutnih u jednom gramu zemljišta. Neki čak analizu bakterijskog diverziteta u jednom gramu zemljišta upoređuju sa analizom globalne ljudske zajednice, jer je ukupan broj individua u obe zajednice reda veličine  $10^9$ . Tipične analize bakterijskog diverziteta zasnivaju se na analizi oko 100 sekvenci iz sredinskih biblioteka, što bi bilo kao da okarakterišemo sve ljude na zemlji analiziranjem samo 100 individua (Prosser *et al.*, 2010). Međutim, iz praktičnih/finansijskih razloga nije moguće u svakoj studiji sekvencirati  $10^6$  klonova.

Sudeći na osnovu zastupljenosti 16S rRNA gena, postoji značajna varijabilnost i u sastavu različitih sredinskih zajednica. Naime, bogatstvo vrsta može biti veoma veliko, kao što je pokazano od strane Torsvik-a i njegovih saradnika (1990), koji su identifikovali više od 4 000 različitih bakterijskih vrsta u 1 g šumskog zemljišta. Sa druge strane, poznato je da 80% do 100% priobalnog bakterioplanktona u Kaliforniji čini samo jedna bakterijska grupa (Rehnstam *et al.*, 1993).

S obzirom da se metagenomske studije zasnivaju na analizi dobijenih 16S rDNK sekvenci upoređivanjem sa već dostupnim sekvencama u bazama podataka, efikanost ovakvog pristupa zavisi od više faktora. Veliki problem su priroda i tačnost

sekvenci u bazama podataka. Baze podataka sadrže sekvence iz kultivisanih mikroorganizma, ali i sekvence poreklom od sredinskih klonova, umnoženih direktno iz metagenomskih DNK. Takođe, i dužina sekvenci i region koji je umnožen veoma variraju u zavisnosti od toga koji su prajmeri korišćeni. 16S rDNK baze podataka sadrže veliki broj sekvenci, ali njihov kvalitet nije kontrolisan. Ashelford i saradnici (2006) su sugerisali da preko 5% sekvenci u bazama podataka sadrže anomalije, dok čak 3% predstavljaju himerne sekvence i pored postojanja programa za detekciju himernih molekula (Ashelford *et al.*, 2006; DeSantis *et al.*, 2006).

I pored svih nedostataka, ovo je i dalje metod izbora za filogenetske analize i identifikaciju i nesumljivo je od velikog značaja. Identifikacija se postiže BLAST pretraživanjem i/ili konstrukcijom filogenetskih stabala. Ukoliko se filogenetska analiza i konstrukcija filogenetskih stabala uradi na velikom broju sekvenci iz iste sredine, može dovesti i do otkrića novih filogenetskih grupa (Prosser *et al.*, 2010) kao sto je slučaj sa bakterijama iz termalnog izvora u nacionalnom parku Jeloustoun (*eng.* Yellowstone; Hugenholtz *et al.*, 1998b).

Akumulacija metagenomskih podataka bi omogućila da se neki od nedostataka ovakvog pristupa analizi diverziteta postepeno prevaziđu. Do danas je metagenomskim pristupima samo zagrebana površina genomskog, metaboličkog i filogenetskog diverziteta koji se nalazi u zemljišnom metagenomu, i s toga je veoma značajno nastaviti istraživanja na ovom polju. Iako je načinjen veliki napredak u



analizi mikrobioloških zajednica upotrebom pirosekvenciranja, neophodno je dodatno unapređivanje tehnologija za sekvenciranje, kao i razvoj boljih bioinformatičkih alata.

Bakterijski diverzitet u rizosferama endemoreliktnih biljaka *R. serbica* i *R. nathaliae* je siromašan, a dobijeni podaci o bogatstvu vrsta su najverovatnije nepotpuni, ali oni ipak daju uvid u diverzitet, i takođe dopunjuju do sada akumulirane podatke dobijene metagenomskim pristupom.

## 5.2. Fluorescentna *in situ* hibridizacija

Razvoj metode fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) imao je veliki uticaj na izučavanje mikrobiološkog diverziteta u sredinskim uzorcima.

Ova metoda podrazumeva upotrebu fluorescentno obeleženih proba koje su specifične za 16S rRNK, čime se mogu identifikovati metabolički aktivne bakterije. U FISH analizi se najčešće koristi jedna proba specifična za domen bakterija kako bi se procenio broj bakterija u sredinskom uzorku. Dodatno, za procenu diverziteta, mogu se koristiti i probe specifične za pojedine rodove ili vrste (López-Archilla *et al.*, 2004; Grenni *et al.*, 2009).

U ovom radu korišćena je rodaminom obeležena EUB338 (Lee *et al.*, 1999) proba specifična za domen *Bacteria*, koja je poslužila za procenu ukupnog broja

bakterija u uzorku proučavanih rizosfera endemoreliktnih biljaka. Rezultati dobijeni FISH analizom upoređeni su sa rezultatima dobijenim u tradicionalnim metodama kultivacije i brojanja kolonija (Rezultati, Tabela 4.1.). Broj metabolički aktivnih bakterija po gramu zemljišta na kome raste *R. serbica* dobijenih FISH analizom iznosio je  $2 \times 10^9$ , što je oko 1000 puta više od broja vijabilnih kolonija izolovanih na različitim podlogama po gramu zemljišta (CFU/g). Za rizosferno zemljište *R. nathaliae* utvrđeno je da je broj vijabilnih kolonija po gramu zemljišta (CFU/g) oko 100 puta manji od broja metabolički aktivnih bakterija (FISH). Ovo dodatno potvrđuje činjenicu da se mali broj bakterija može izolovati tradicionalnim metodama kultivacije i da je za procenu diverziteta potrebno uključiti i metode nezavisne od izolacije bakterija (metagenomika i FISH).

### 5.3. Izolacija i karakterizacija bakterija koje razgrađuju fenol

Fenol i njegovi derivati su zagađivači prirodne sredine i nastaju kao rezultat kako ljudskih aktivnosti tako i prirodnih procesa. Glavni proizvođači fenola su rafinerije i petrohemijska industrija. S druge strane, fenol u prirodnoj sredini može biti i proizvod razgradnje jedinjenja organskog porekla, a takođe i više biljke sintetišu fenole u stresnim uslovima radi uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Fenol koji je dospao u prirodnu sredinu može biti uklonjen na više načina – fizičkim, hemijskim ili biološkim metodama (Schie i Young, 2000; Farhadian *et al.*, 2008). Biološki oporavak (*eng.* bioremediation) se ističe kao najisplativiji i ekološki najprihvatljiviji metod (Lynch i Moffat, 2005). Zbog sveprisutnosti fenola u prirodnoj sredini i prednosti metode biološkog oporavka sve češća su istraživanja u pravcu izolacije mikroorganizama koji efiksno razgrađuju fenol i njegove derivate.

Pretretmanom zemljišta rizosfera *R. serbica* i *R. nathaliae* fenolom, izolovano je 13 fenol tolerantnih bakterija iz rizosfere *R. serbica* i 10 fenol tolerantnih bakterija iz rizosfere *R. nathaliae*. Bakterije su testirane na sposobnost razgradnje fenola i pokazano je da tri bakterijska soja iz rizosfere *R. serbica* (PS1, PS11 i PS12) i jedan iz rizosfere *R. nathaliae* (PN1) mogu koristiti fenol kao jedini izvor ugljenika. Ove bakterije su imale sposobnost razgradnje fenola do koncentracije od 2000 mg/l, na 30°C i pH 7.2.

Poređenjem ovih podataka sa podacima iz literature može se zaključiti da izolovane bakterije mogu razgraditi veće koncentracije fenola. Postoje podaci da *Pseudomonas putida* F1 (ATCC 700007) toleriše/razgrađuje fenol u koncentracijama od 750 - 1750 mg/l (Abuhamed *et al.*, 2004), *Alcaligenes faecalis* toleriše/razgrađuje fenol u koncentracijama od 10 – 1400 mg/l (Bai *et al.*, 2007).

Ovako visoka tolerancija, odnosno sposobnost razgradnje fenola koja je utvrđena kod sojeva izolovanih u ovom radu je najverovatnije posledica veoma duge

izloženosti visokim koncentracijama fenola u rizosferama endemoreliktnih biljaka, pa su sojevi razvili efikasne mehanizme razgradnje fenola.

U poređenju sa ostalim testiranim sojevima PS11 je razgradio 400 mg/l fenola iz medijuma za samo dva dana (Slika 4.6). Soj PS11 za jedan dan razgradi 6 puta više fenola od preostala tri soja (PS11, PS12 i PN1), pa je potencijalno i najbolji kandidat za primenu u biološkom oporavku zemljišta zagađenog fenolom.

Poređenjem 16R rDNK sekvenci sa sekvencama dostupnim u RDP bazi podataka (Cole *et al.*, 2009) pokazano je da sojevi PS1 i PS11 pripadaju rodu *Bacillus*, gde je *Bacillus simplex* ATCC 49097 (AJ439078) najbliži srodnik PS1 i *Bacillus cereus* ATCC 147579 (AE016872) najbliži srodnik PS11. Sojevi PS12 i PN1 pripadaju rodu *Streptomyces*, gde se *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 (AB045890) pokazao kao najbliži PS12, a *Streptomyces zaomyceticus* ATCC 27482 (EF178685) kao najbliži PN1. Međutim, filogenetska analiza ne podržava u potpunosti RDP analizu, jer su se sojevi PS1 i PN1 prilikom rekonstrukcije filogenetskih stabala izdvojili od svojih najbližih srodnika (Rezultati, Slika 4.8.). Sojevi su dodatno okarakterisani i biohemijskim testovima. Takođe, za soj PN1 određeni su i GC sastav (70%) i izomer DAP (LL) koji ulazi u sastav peptidoglikana u ćelijskom zidu.

Izolacija i karakterizacija bakterija sa potencijalom razgradnje fenola je od velikog značaja za zaštitu prirodne sredine. Sojevi izolovani u ovom radu, PS1, PS11,

PS12 i PN1, nisu pokazali filogenetsku sličnost sa ranije izolovanim bakterijama koje imaju sposobnost razgradnje fenola.

Mikroorganizmi koji imaju sposobnost razgradnje fenola su česti i mogu biti kako anaerobni tako i aerobni. Do sada je izolovan veliki broj aerobnih bakterija koje mogu razgrađivati fenol, a opisani su i njihovi putevi razgradnje fenola (Schie i Young, 2000). U prvom koraku razgradnje fenola učestvuje enzim fenol hidroksilaza (PH) pri čemu nastaje katehol. Otvaranje kateholnog prstena može biti katalizovano enzimom katehol 1,2–dioksigenazom (C12O), gde se kateholni prsten otvara u položaju između dve hidroksilne grupe (*orto* put), ili enzimom katehol 2,3–dioksigenazom (C23O) koja hidrolizuje katehol u *meta* položaju u odnosu na hidroksilne grupe (*meta* put) (Andreoni and Gianfreda, 2007). Bakterije najčešće razgrađuju fenol jednim od dva puta, dok samo mali broj bakterija koristi oba puta razgradnje fenola (Jiang *et al.*, 2006). Sojevi PS1 i PS12 poseduju samo enzim C12O, i samim tim razgrađuju fenol u *orto* putu, dok sojevi PS11 i PN1 poseduju i enzim C23O, pa fenol razgrađuju kako u *orto* tako i u *meta* putu što je eksperimentalno pokazano, jer su uočene istovremene aktivnosti oba enzima.

Praćene su i aktivnosti enzima u ćelijskim ekstraktima sojeva koji razgrađuju fenol. Enzim fenol hidroksilaza iz sojeva PS11 i PN1 dostiže maksimalnu aktivnost 15 puta brže od PH enzima iz sojeva PS1 i PS12. U poređenju sa prethodno objavljenim podacima za PH enzim iz *Candida tropicalis* (Ahuatzi-Cacon *et al.*, 2004), *Acinetobacter*,

*Stenotrophomonas*, i *Ralstonia* (Zaki, 2006), gde ovaj enzim dostiže maksimum aktivnosti za nekoliko sati, PH enzim iz sojeva PS11 i PN1 maksimum dostiže posle samo dva minuta reakcije (Slika 4.12.). Na osnovu ovih podataka bi se moglo zaključiti da PH enzim iz sojeva PS11 i PN1 ima mnogo bolje karakteristike od do sada opisanih PH enzima.

Specifična aktivnost enzima C12O i C23O je ne samo veoma međusobno slična, već je slična i sa prethodno objavljenim podacima za ove enzime iz drugih sojeva koji razgrađuju fenol (Zaki, 2006; Jiang *et al.*, 2006).

Određeni su i kinetički paramteri PH, C12O i C23O enzima u ćelijskim ekstraktima sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1. Vrednosti Michaelis-ove konstate ( $K_m$  između 51 i 56 nM) za PH enzim iz ovih sojeva su znatno manje od prečišćenog PH enzima iz *Candida tropicalis* (0, 45 mmol/l) (Vilímková *et al.*, 2008). Ovaj podatak ukazuje da PH enzimi iz sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1 imaju znatno veći supstratni afinitet od PH enzima iz *C. tropicalis*. Enzimi C12O i C23O iz sojeva izolovanih u ovom radu takođe imaju veći afinitet prema supstratu u poređenju sa ranije ispitivanim C12O i C23O. Enzim iz *Sphingomonas xenophaga* QYY ima  $K_m = 52,85 \mu\text{M}$  (Gou *et al.*, 2009), što je 13 puta više od  $K_m$  iz sojeva analiziranih u ovo radu, dok je C12O iz *Pseudomonas reinekei* MT1 sa vrednošću  $K_m = 2 \mu\text{M}$  (Kamara *et al.*, 2009) slična sa  $K_m$  iz testiranih sojeva. Prečišćeni enzim C23O iz *Pseudomonas putida* MT4



ima  $K_m$  od 23,4  $\mu\text{M}$  (Takeo *et al.*, 2007), što je skoro 6 puta veća vrednost od  $K_m$  C23O enzima iz sojeva PS11 i PN1.

Kako bi se odredilo da li su enzimi koji učestvuju u putevima razgradnje fenola unutarćelijski ili se izlučuju u spoljašnju sredinu, testirane su aktivnosti enzima kako u ćelijskom ekstraktu tako i u vanćelijskim frakcijama. Specifične aktivnosti enzima u unutarćelijskoj i ekstraćelijskim frakcijama (ćelijski lizat, pufer kojim su ispirane ćelije i medijum u kome su rasle) su pokazale veliku sličnost kada je vršena normalizacija na totalnu koncentraciju proteina u svim frakcijama. Međutim, ukoliko se specifične aktivnosti enzima normalizuju na koncentraciju proteina po frakciji, specifične aktivnosti enzima su značajno manje u unutarćelijskoj frakciji, jer je koncentracija proteina unutar ćelije deset puta veća nego van nje. Iz ovoga bi se moglo zaključiti da su većina proteina koje ove bakterija izlučuju prilikom gajenja u minimalnom medijumu sa fenolom, ustvari enzimi koji učestvuju u katabolizmu fenola. S obzirom da su enzimi PH, C12O i C23O aktivni i u ćeliji i van nje, moguće je da su oni prisutni u obe frakcije kako bi uklanjajući fenol što efikasnije štitili samu bakteriju kako od samog kontakta sa fenolom (izlučeni enzimi), tako i u slučaju ulaska fenola u ćeliju (unutarćelijska zastupljenost). Kako je ekstraćelijska aktivnost enzima visoka, može se pretpostaviti da je time omogućena kohabitacija i mikroorganizmima koji nemaju sposobnost razgradnje fenola. FISH analiza je pokazala da je zastupljenost bakterija u zemljištu visoka, ali je izolovano svega

nekoliko sojeva koji imaju sposobnost razgradnje fenola, te je stoga donekle opravdano pretpostaviti da bakterije koje izlučuju PH, C12O i C23O, omogućavaju preživljavanje i bakterijama koje nemaju sposobnost razgradnje fenola. Takođe postoji i mogućnost da korišćenim tehnikama nisu izolovane sve vrste koje imaju sposobnost razgradnje fenola.

Kako je kod svih sojeva u PCR analizi umnožen deo gena velike subjedinice enzima PH (HM021729 - HM021732), pokazano je da svi sojevi poseduju multikomponentnu fenol hidroksilazu. BLAST analizom umnoženih fragmenata pronađene su sličnosti sa prethodno identifikovanim PH genima. Umnoženi delovi ovog gena iz sojeva PS1 i PS11 najveću sličnost su pokazali sa PH genom iz *Rhodococcus erythropolis* (98% i 99%), dok su PH fragmenti iz sojeva PS12 i PN1 najveću sličnost pokazali sa *Nocardia farcinica* (78% i 79%). Na osnovu velike sličnosti PH gena iz sojeva PS1 i PS11 koji pripadaju rodu *Bacillus* sa PH genima iz *Rhodococcus*-a koji pripada aktinomicetama, može se pretpostaviti da je najverovatnije došlo do horizontalnog tranfera gena. S obzirom da geni koji kodiraju enzime puteva razgradnje fenola mogu biti smešteni na plazmidima, konjugacija je najverovatniji mehanizam kojim se oni prenose kroz bakterijske populacije. Naime, postoje podaci o razmeni genetičkog materijala koji kodira enzime puteva razgradnje fenola između bakterija koje žive na biljkama i u njihovoj rizosferi (Wang *et al.*, 2007). Iz literature je poznato da plazmidi mogu prenositi gene čak i između filogenetski udaljenih

domaćina, uključujući i transfer između Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija ili između bakterija i kvasaca (Adamczyk i Jagura-Burdzy, 2003).

Inserti dobijeni umnožavanjem sa prajmerima za C12O i C23O gene (Sei *et al.*, 1999; Sandhu *et al.*, 2009) su sekvencirani i BLAST analizirani. Kako nisu ponadeni njihovi homolozi sa dostupnim sekvencama gena za C12O i C23O, pretpostavljeno je da je došlo do nespecifičnog vezivanja prajmera. Iako su prajmeri za C12O napravljeni na osnovu poznatih sekvenci gena za C12O i C23O iz Gram-pozitivnih bakterija, ipak njima nisu umnožene odgovarajuće genske sekvence iz streptomiceta (PS12 i PN1) i bacilusa (PS1 i PS11). U literaturi su pronađeni i prajmeri za C12O u čije je dizajniranje uključen veći broj C12O gena iz Gram-pozitivnih bakterija (An *et al.*, 2001), a za C23O dizajnirani su prajmeri na osnovu svih poznatih sekvenci C23O gena iz Gram-pozitivnih bakterija (ovaj rad). Međutim, ni ovim prajmerima nisu dobijeni amplikoni C12O i C23O gena. Najverovatnije objašnjenje je nemogućnost dizajniranja odgovarajućih prajmera kako zbog malog broja podataka o ovim genima iz Gram-pozitivnih bakterija tako i zbog njihove velike heterogenosti.

Bacilusi izolovani u ovom radu, PS1 i PS11, preživljavaju i razgrađuju visoke koncentracije fenola čak do 2000 mg/l i samim tim se mogu smatrati bakterijama sa dobrom sposobnošću razgradnje fenola. Ovi sojevi pripadaju mezofilnim bakterijama sa opsegom rasta od 30 do 39°C (optimum na 30°C). Enzimi PH, C12O i C23O ovih bakterija pokazuju maksimum aktivnosti na 70°C. Malobrojni su podaci o putevima

razgradnje fenola kod bacilusa kao i o karakteristikama enzima koji u ovim putevima učestvuju. Enzimski putevi razgradnje fenola okarakterisani su kod *Bacillus stearothermophilus* (sada *Geobacillus stearothermophilus*) (Dong *et al.*, 1992), dok je za enzim C23O iz termofilne bakterije *Bacillus thermoleovorans* pokazano da maksimalnu aktivnost ispoljava na 70°C (Milo Rosvita *et al.*, 1999).

*Streptomyces setonii* je bila prva bakterija iz roda *Streptomyces* za koju je pokazano da ima sposobnost razgradnje fenola (Antai i Crawford, 1983). Ova termotolerantna zemljišna aktinomiceta razgrađuje fenola na 45°C, a C12O enzim pokazuje aktivnost u opsegu temperature od 25°C do 65°C, sa maksimumom na 45°C (An *et al.*, 2001). Međutim, podaci o 16S rDNK sekvenci ove bakterije sugerišu da je ona najverovatnije novi predstavnik roda *Amycolatopsis*, a ne roda *Streptomyces* (An *et al.*, 2001). Sojevi PS12 i PN1 izolovani u ovom radu pripadaju streptomicetama i mogu rasti na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika (do 2000 mg/ml) u opsegu temperature od 30 do 37°C. Enzimi iz ovih streptomiceta, koji učestvuju u katabolizmu fenola, maksimalnu aktivnost ispoljavaju na 70°C.

Bakterije izolovane u ovom radu spadaju u grupu netipičnih bakterija sa sposobnošću razgradnje fenola. Stoga podaci o njima samima, njihovim putevima razgradnje fenola i enzimima koji u tome učestvuju, doprinose boljem razumevanju rasprostranjenosti puteva razgradnje fenola među bakteijskim vrstama. Takođe, ovi sojevi zbog svojih fizioloških karakteristika, profila razgradnje fenola i karakteristika

enzima (enzimska kinetika, kinetički parametri), predstavljaju veoma dobre kandidate za *in situ* studije biološkog oporavka zemljišta zagađenog fenolom.

## VI ZAKLJUČCI

Na osnovu cilja rada i dobijenih rezultata definisano je 17 zaključaka:

- + Konstruisane su biblioteke sredinskih 16S rDNK klonova (sredinske biblioteke) iz rizosfera *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae*.
- + Na osnovu ARDRA/RFLP analize 16S rDNK klonovi iz biblioteka grupisani su u OTJ. Sredinska biblioteka rizosfere *R. serbica* sadržala je 13 OTJ, dok je sredinska biblioteka rizosfere *R.nathaliae* sadržala 35 OTJ.
- + Sekvenciranjem i bioinformatičkom analizom utvrđeno je da u rizosferi *R. serbica* 40% bakterija pripada nekultivisanim  $\alpha$ -*Proteobacteria*, a oko 30% nekultivisanim  $\beta$ -*Proteobacteria*. Među bakterijama koje je moguće kultivisati najzastupljenije su proteobakterije sa 15%. U rizosferi *R. nathaliae* više od polovine bakterija pripada nekultivisanim bakterijskim grupama, 25% aktinomicetam, 10% acidobakterijama i oko 30% drugim nekultivisanim bakterijama. Među bakterijama koje je moguće kultivisati najzastupljenije su streptomicete sa 15% i pseudomonade sa oko 10%.



- ✚ FISH analiza je pokazala da u rizosferi *R. serbica* ima ukupno  $2 \times 10^9$  metabolički aktivnih bakterija, dok u rizosferi *R. nathaliae* ima  $9 \times 10^8$  metabolički aktivnih bakterija. Metabolički aktivne bakterije čine samo oko 5% ukupnog broja bakterija u uzorku.
- ✚ Selekcija bakterija tolerantnih na fenol rađena je metodom pretretmana zamljišta sa 1,5% fenolom. Iz rizosfere *R. serbica* izolovano je 13 bakterija tolerantnih na fenol, a 10 iz rizosfere *R. nathaliae*.
- ✚ Od 13 fenol tolerantnih bakterija iz rizosfere *R. serbica* tri izolata (PS1, PS11 i PS12) su pokazala sposobnost rasta na fenolu kao jednom izvoru ugljenika.
- ✚ Od 10 bakterija tolerantnih na fenol izolovanih iz rizosfere *R. nathaliae*, samo jedan izolat (PN1) posedovao je sposobnost rasta na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika.
- ✚ Sojevi PS1 i PS12 razgrađuju fenol u *orto* putu, dok sojevi PS11 i PN1 fenol razgrađuju kako u *orto* tako i u *meta* putu.
- ✚ Utvrđeno je da su optimalni uslovi za rast sojeva PS1, PS11, PS12 i PN1 na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika, 30°C i pH 7,2.



- ✚ Svi sojevi su pokazali rast na fenolu kao jedinom izvoru ugljenika na svim testiranim koncentracijama (200 – 2000 mg/l). Soj PS11 za jedan dan iskoristi šest puta više fenola u odnosu na sojeve PS1, PS12 i PN1.
- ✚ Filogenetska analiza pokazala je da su sojevi PS1 i PS11 najsirodniji *Bacillus cereus* odnosno *Bacillus simplex*, dok su PS12 i PN1 najsirodniji *Streptomyces venezuelae* odnosno *Streptomyces zaomyceticus*.
- ✚ Za sve testirane sojeve (PS1, PS11, PS12 i PN1) određeni su pH i temperaturni optimum ključnih enzima (fenol hidroksilaza, katehol 1,2–dioksigenaza i katehol 2,3–dioksigenaza) koji učestvuju u putevima razgradnje fenola. Temperaturni optimum za sve testirane enzime je na 70°C. Fenol hidroksilaza iz svih sojeva ima optimum na pH 7,8, dok je pH optimum za enzime katehol 1,2- i 2,3-dioksigenazu na 10,6.
- ✚ Utvrđeno je da se testirani enzimi nalaze kako u unutarćelijskoj frakciji, tako i u ekstraćelijskim frakcijama.
- ✚ Utvrđena je kinetika enzima koji učestvuju u putevima razgradnje fenola. Enzim fenol hidroksilaza iz sojeva PS11 i PN1 maksimalnu aktivnost od 0,7 odnosno 0,6 U/mg ispoljava posle 2 – 3 minuta od početka reakcije, dok fenol



hidriksilaza iz sojeva PS1 i PS12 maksimalnu aktivnoat od 0,68 i 0,45 U/mg ispoljava nakon 30 minuta. Enzim katehol 1,2-dioksigenaza iz svih testiranih sojeva maksimum aktivnosti od 4,5 U/mg do 5,5 U/mg ispoljava u 8 satu reakcije. Katehol 2,3-dioksigenaza iz sojeva PS11 i PN1 maksimum aktivnosti od 0,1 odnosno 0,065 U/mg ispoljava takođe u 8 satu reakcije.

✚ Određeni su i kinetički parametri enzima:

Enzim	Kinetički parametri	PS1	PS11	PS12	PN1
PH	Km (nM)	56,4	51,2	54,3	51,8
	Vmax (U/min)	0,0186	0,022	0,018	0,021
C12O	Km (nM)	2600	1700	2500	3100
	Vmax (U/min)	0,00238	0,0039	0,0028	0,00295
C23O	Km (nM)	-	4500	-	3800
	Vmax (U/min)	-	0,0027	-	0,00264

✚ Na osnovu analize umnoženih fragmentata gena velike subjedinice fenol hidroksilaze, pokazano je da su geni z sojeva PS1 i PS11 najsličniji genima iz *Rhodococcus erythropolis* (sa 98% odnosno 99%), dok su geni iz sojeva PS12 i PN1 najsličniji (sa 78% odnosno 79%) PH genima iz bakterije *Nocardia farcinica*. Geni

VII za enzime katehol 1,2–dioksidogenazu i katehol 2,3–dioksidogenazu nisu mogli biti umnoženi.

- ✚ Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavljeno je da su analizirani sojevi dobri za primenu u biološkom oporavku zemljišta zagađenog fenolom.

## VII LITERATURA

Abd-El-Haleem D., Moawad H., Zaki E.A., Zaki S. (2002). Molecular characterization of phenol-degrading bacteria isolated from different Egyptian ecosystems. *Microbial Ecol.* 43: 217-224.

Abuhamed T., Bayraktar E., Mehmetoglu T., Mehmetoglu U. (2004). Kinetics model for the growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochem.* 39: 983-988.

Adamczyk M. and Jagura-Burdzy G. (2003). Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochem Pol.* 50:425-453.

Adav S.S., Lee D.J., Reen N.Q. (2007). Biodegradation of pyridine using aerobic granules in the presence of phenol. *Water Res.* 41: 2903-2910.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1998). Toxicological profile of phenol. In U.S: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.

Ahuatzi-Cacon D., Ordorica-Morales G., Ruiz-Orday N., Cristioani-Urbina E., Juarez-Ramirez C., Galíndez-Mayer J. (2004). Kinetic study od phenol hydroxylase



and catechol 1,2-dioxygenase biosynthesis by *Candida tropicalis* cells grown in different phenolic substrates. *World J Microbiol Biotech.* 20: 695-702.

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer 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 Res.* 25: 3389-3402.

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K-H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59: 143-169.

Amann R., Snaidr J., Wagner M., Ludwig W., Schleifer K.H. (1996). In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J Bacteriol.* 178: 3496-3500.

Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr Opin Biotech.* 12: 231-236.

An H.-R., Park H.-J., Kim E.-S. (2001). Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol Lett.* 195: 17-22.



Andreoni V. and Gianfreda L. (2007). Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Appl Microbiol Biotech.* 76: 287-308.

Antai S.P. and Crawford D.L. (1983). Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Can J Microbiol.* 29: 142-143.

Artuchelvan V., Kanakasabai V., Nagrajan S., Muralikrishnan V. (2005). Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J Hazard Mater.* 127: 238-243.

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 RDP-II database. *Nucleic Acids Res.* 30: 3481-3489.

Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Waighzman A.J. (2006). New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol.* 72: 5734-5741.

Bai J., Wen J.P., Li H.M., Jiang Y. (2007). Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. *Process Biochem.* 42: 510-517.

Bailey M.J. (2004). Life in the phyllosphere. In *Pseudomonas, genomics, life style and molecular architecture*, Ramos J.L. (Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, pp. 431-456.

Banerjee A. and Ghoshal A.K. (2010). Isolation and characterization of hyper phenol tolerant *Bacillus* sp. from oil refinery and exploration sites. *J Hazard Mater.* 176: 85-91.

Behrens S., Fuchs B.M., Mueller F., Amann R. (2003). Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of the *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model for the 30S ribosomal subunit? *Appl Environ Microbiol.* 69: 4935-4941.

Berg G., Roskot N., Steidle A., Eberl L., Zock A, Smalla K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3328-3338.

Berg G., Zachow C., Lottmann J., Gotz M., Costa R., Smalla K. (2005). Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4203-4213.

Bewley J.D. and Krochko J.E. (1982). Desiccation tolerance. In *Encyclopedia of plant physiology – water relations and carbon assimilation*, Lange O.L., Nobel P.S., Osmond C.B., Ziegler H. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 325-378.

Binder B.J. and Liu Y.C. (1998). Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (Cyanobacterium) strain. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3346-3351.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 1513-1523.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Brown J.R., Douady C.J., Italia M.J., Marshall W.E., Stanhope M.J. (2001). Universal trees based on large combined protein sequence datasets. *Nat Genet.* 28: 281-285.

Busse J. and Auling G. (1988). Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within Proteobacteria. *Syst Appl Microbiol.* 11: 1-8.

Cafaro V., Notomista E., Capasso P., Di Donato A. (2005). Regiospecificity of two multicomponent monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: molecular basis for catabolic adaptation of this microorganism to methylated aromatic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4736- 4643.

Cai W., Li J., Zhang Z. (2007). The characteristics and mechanism of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *J Hazard Mater.* 148: 38-42.

Cardoso R.B., Texier A.C., Solis Á.A., Gómez J., Flores E.R. (2009). Phenol and sulfide oxydation in a denitrifying biofilm reactor and its microbial community analysis. *Process Biochem.* 44: 23-28.

Cavalier-Smith T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Transac R Society B: Biol Sci.* 361: 969-1006.

Chen W.M., Chang J.S., Wu C.H., Chang S.C. (2004). Characterisation of phenol and trichlorethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Res Microbiol.* 155: 672-680.

Chen C.L., Wu J.H., Liu W.T. (2008). Identifiacion of important microbial populations in the mesophilic and thermophilic phenol-degrading methanogenic consortia. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78: 863-872.

Ciccarelli F.D., Doerks T., von Mering C., Creevey C.J., Snel B., Bork P. (2006). Toward authomatic reconstruction of highly resolved tree of life. *Science.* 311: 1283-1287.

Clayton R.A., Sutton P.S., Hinkle Jr., Bult C., Fields C. (1995). Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GeneBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. *Int J Syst Bacteriol* 45: 595-599.

Cline J., Braman J.C., Hogrefe H.H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*. 24: 3546-3551.

Cole S.T. and Giron S.I. (1994). Bacterial genomics. *FEMS Microbiol Rev*. 14: 139-160.

Cole J., Chai B., Farris R. J., Wang Q., Kulam S. A., McGarrell D. M., Garrity G. M., Tiedje J. M. (2005). "The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis." *Nucleic Acids Res*. 33: 294-296.

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 37: 141-145.

Cole J.R., Konstantinidis K., Farris R.J., Tiedje J.M. (2010). Microbial diversity and phylogeny: extending from rRNAs to genomes. In *Environmental molecular microbiology*, Liu W.T. and Jansson J.K. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 1-19.

Curtis T.P. and Sloan W.T. (2005). Exploring microbial diversity - a vast below. *Microbiology*. 309: 1331 – 1333.

Dagley S., Evans W.C., Ribbons D.W. (1960). New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Nature*. 188: 560-566.

Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. (2005). Phylogenomic and reconstruction of the tree of life. *Nat Rev Genet*. 6: 361-375.

DeRito C.M., Pumphrey G.M., Madsen E.L. (2005). Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil microbial community. *Appl Environ Microbiol*. 71: 7858-7865.

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene databases and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 72: 5069-5072.

Devinny J.S. (1998). Clearing the air biologically. *Civil Eng*. 68: 46–49.

Dinsdale E.A., Edwards R.A., Hall D., Angly F., Breitbart M., Brulc J.M., Furlan M., Desnues C., Haynes M., Li L., McDaniel L., Moran M.A., Nelson K.E., Nilsson C., Olson R., Paul J., Rodriguez-Brito B., Ruan Y., Swan B.K., Stevens R., Valentine D.L.,



Vega-Thurber R., Wegley L., White B.A., Rohwer F. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*. 452: 629–632.

Donachie S.P., Foster J.S., Brown M.V. (2007). Culture clash: challenging the dogma of microbial diversity. *ISME J*. 1: 97–102.

Dong F.M., Wang L.L., Wang C.M., Chang J.P., He Z.Q., Sheng Z.J., Shen R.Q. (1992). Molecular cloning and mapping of phenol degradation genes from *Bacillus stearothersophilus* FDTP-3 and their expression in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 58: 2531–2535.

Đokić L. (2004). Analiza 16S rRNK biblioteka poreklom od totalne DNK izolovane iz rizosfera endemoreliktnih biljaka *Ramonda serbica* i *Ramonda nathaliae*. Diplomski rad, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Eck R. and Bettler J. (1993). Cloning and characterization of a gene coding for the catechol 1,2-dioxygenase of *Arthrobacter* sp. mA3. *Gene*. 123: 87-92.

Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., Haynes M., Breitbart M., Peterson D.M., Saar M.O., Alexander S., Alexander E.C., Rohwer F. (2006). Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics*. 7: 57.

Egrov N.S. (1985). Antibiotics: A scientific approach. MIR publishers, Moscow, pp. 17-410.

Ehrt S, Schirmer F, Hillen W. (1995). Genetic organization, nucleotide sequence and regulation of expression of genes encoding phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *Mol Microbiol.* 18: 13-20.

el Zahr Z., Haichar F., Marol C., Berge O., Rangel-Castro J.I., Prosser J.I., Baldsdent J., Heulin T., Achouak W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME J.* 2: 1221-1230.

El-Sayed W.S., Ibrahim M.K., Abu-Shady M., El-Beih F., Ohmura N., Saiki H., Ando A. (2003). Isolation and characterization of phenol catabolizing bacteria from a coking plant. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 2026-2029.

Espinosa-Urgel M. and Ramos J-L. (2004). Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol.* 70: 5190-5198.

Eulberg D., Golovleva L.A., Schlömann M. (1997). Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. *J Bacteriol.* 179: 370-381.

Farhadian M., Vachelard C., Duchez D., Larroche C. (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Biores Technol.* 99: 5296-5308.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 783-791.

Felsenstein J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Fuchs B.M., Wallner G., Beisker W., Schwippl I., Ludwig W., Amann R. (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4973-4982.

Fuchs B.M., Glökner F.O., Wulf J., Amann R. (2000). Unlabelled helper oligonucleotide increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 66: 3603-3607.

Futamata H., Harayama S., Watanabe K. (2001). Diversity on kinetics of trichloroethylene activities exhibited by phenol degrading bacteria. *Appl Microbiol Biotech.* 35: 248-253.

Gabor E.M., de Vries E.J., Janssen D.B. (2003). Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 44: 153-163.

Gaff D.F. (1981). The biology of resurrection plants. In *The biology of Australian plants*, Pate J.S. and McComb A.J. (Eds.), University of Western Australia Press, Perth, Australia, pp. 114-146.

Gans J., Wolinsky M., Dunbar J. (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science.* 309: 1387 – 1390.

Garcia V.T., Ventosa A., Mellado E. (2005). Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol.* 54: 97-109.

Gianfreda L., Iamarino G., Scelza R., Rao M.A. (2006). Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. *Biocatal Biotransform.* 24: 177-187.

Gogarten J.P. and Townsend J.P. (2005). Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Rev Microbiol.* 3: 679-687.

Goodfellow M. and Cross T. (1984). Classification. In *The biology of actinomycetes*, Goodfellow M., Mordarski M., Williams S. (Eds.), Academic Press, London, UK, pp. 7-164.

Gophna U., Doolittle W.F., Charlebois R.L. (2005). Weighted genome trees: refinements and applications. *J Bacteriol.* 187: 1305-1316.

Gou M., Qu Y.Y., Zhou J.T., Li A., Salah Uddin M. (2009). Characterization of catechol 1,2-dioxygenase from cell extracts of *Sphingomonas xenophaga* QYY. *Sci China Series B: Chemistry.* 52: 615-620.

Green J.L. and Bohannan B.J.M. (2006). Spatial scaling of microbial diversity. *Trends Ecol Evol.* 21: 501-507.

Grenni P., Gibello A., Caracciolo A.-B., Fajardo C., Nande M., Vargas R., Saccà M.-L., Martinez-Inigo M.-J., Ciccoli R., Martin M (2009). A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Res.* 43: 2999-3008.

Griffiths R.I., Bailey M.J., McNamara N.P., Whitley A.S. (2006). The functions and components of the Sourhope soil microbiota. *Appl Soil Ecol.* 33: 114-126.

Gutell R.R., Larsen N., Woese R.C. (1994). Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S structure from a comparative perspective. *Microbiol Rev.* 58: 10-26.

Hamzah R.Y. and Al-Baharna B.S. (1994). Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of *ortho* and *meta* pathway. *Appl Environ Microbiol.* 41: 250-256.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166: 557-580.

Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 5: 245-249.

Harwood C.S. and Parales R.E. (1996). The  $\beta$ -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol.* 50: 553-590.

Heinaru E., Truu J., Stottmeister U., Heinaru A. (2000). Three types of phenol and *p*-cresol catabolism in phenol- and *p*-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiol Ecol.* 31: 195-205.



Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Rüegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F., Egli T., Mau M., Schlömann M., Brennerova M., Brenner V., Pieper D.H., Top E. M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. (2006). Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods*. 64: 250-265.

Hiltner L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf Dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*. 98: 59-78.

Hino S., Watanabe K., Takahashi N. (1998). Phenol hydroxylase cloned from *Ralstonia eutropha* strain E2 exhibits novel kinetic properties. *Microbiology*. 144: 1765-1772.

Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M., Schrempf H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK.

Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. (2004). "Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments." *Bioinformatics*. 20: 2317-2319.

Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. (1998a). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol.* 180: 4765-4774.

Hugenholtz P., Pituelle C., Hershberger K.L., Pace N.R. (1998b). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol.* 180: 366-376.

Hunt D.E., David L.A., Gevers D., Preheim S.P., Alm E.J., Polz M.F. (2008). Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320: 1081-1085.

Huston M.A. (1994). *Biological diversity*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Jiang Y., Wen J.P., Li H.M., Yang S.L., Hu Z.D. (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentrations by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J.* 24: 243-247.

Jiang H.L., Tiong-Lee S., Maszenan A.M., Tay J.H. (2006). Physiology traits of bacterial strains isolated from phenol-degrading aerobic granules. *FEMS Microbiol Ecol.* 57: 182-191.

Junca H. and Pieper D.H. (2003). Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3-dioxygenase gene diversity in soil bacteria. *J Microbiol Methods*. 55: 697-708.

Kamara B., Nikodem P., Bielecki P., Bobadilla R., Junca H., Pieper D. H. (2009). Characterization of a gene cluster involved in 4-chlorocatechol degradation by *Pseudomonas reinekei* MT1. *J Bacteriol*. 191: 4905-4915.

Kämpfer P. (1998). Some chemotaxonomic physiological properties of genus *Sphaerotilus*. *System Appl Microbiol*. 21: 245-250.

Kivisaar M., Kasak L., Nurk A. (1991). Sequence of the plasmid-encoded catechol 1,2-dioxygenase-expressing gene, *pheB*, of phenol-degrading *Pseudomonas* sp. strain EST1001. *Gene*. 98: 15-20.

Komagata K. and Suzuki K.-I. (1987). Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. In *Methods in microbiology*, Colwell R.R. and Grigorova R. (Eds), Academic Press, London, UK, pp. 161-209.

Konstantinidis K.T. and Tiedje J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci US*. 102: 2567-2572.

Kowalchuk G. A., Bauma D.S., de Boer W., Klinkhamer P.G.L., van Veen J.A. (2002). Effect of above ground plant species composition and on the diversity of soil-born microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 81: 509-520.

Kowalchuk G.A., Yergeau E., Leveau J.H.J., Sessitsch A., Bailey M. (2010) Plant-associate Microbial Communities. In Environmental molecular microbiology, Liu W.T. and Jansson J.K. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 131-148.

Kukor J.J. and Olsen R.H. (1991). Genetic organization and regulation of a *meta* cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol, and cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J Bacteriol*. 172: 4587-4594.

Lane D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic acid techniques in bacterial systematic, Stackebrandt E. and Goodfellow M.M. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., Chichester, UK, pp. 115-175.

Lee N., Halkjaer P., Andreasen P.H., Juretschko S., Nielsen J.P., Schleifer, K.-H., Wagner M. (1999). Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol*. 65: 1289-1297.

Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L.J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 63: 4516-4522.

Loy A., Maixner F., Wagner M., Horn M. (2007). probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35: 800-804.

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

Lutenberg B.J.J., Dekkers L., Bloemberg G.V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann Rev Phytopath.* 39: 461-490.

Lynch J.M. and Whipps J.M. (1990). Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and soil.* 129: 1-10.

Lynch J.M. and Moffat A.J. (2005). Bioremediation – prospects for the future application of innovative applied biological research. *Ann Appl Biol.* 146: 217-222.

López-Archilla A.I., Gérard E., Moreira Dz. L -García P. (2004). Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiol Lett.* 235: 221-228.

Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Wade W.G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 64: 795-799.

Margesin R., Labbé D., Schinner F., Greer C.W., Whyte L.G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl Environ Microbiol.* 69: 3085–3092.

Mars A.E., Kasberg T., Kaschabek S.R., Van Agteren M.H., Janssen D.B., Reineke W. (1997). Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. *J Bacteriol.* 179: 4530-4537.

Marschner H. (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press, London, UK, pp. 889.

Martin R.W. (1949). Rapid colorimetric estimation of phenol. *Anal Chem.* 21: 1419-1420.

Merimaa M., Heinaru E., Liivak M., Vedler E., Heinaru A..(2006). Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch Microbiol.* 186: 287-96.



Michaux S., Paillisson M. J., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Allardet-Servent A. (1993). Presence of independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol.* 175: 701-705.

Milo Rosvita E., Duffner Fiona M., Muller R. (1999). Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. *Extremophiles.* 3: 185-190.

Moiseeva OV, Solyanikova IP, Kaschabek SR, Gröning J, Thiel M, Golovleva LA, Schlömann M. (2002). A new modified *ortho* cleavage pathway of 3-chlorocatechol degradation by *Rhodococcus opacus* 1CP: genetic and biochemical evidence. *J Bacteriol.* 184: 5282-92.

Morgenroth E., Obermayer A., Arnold E., Brühl A., Wagner M., Wilderer P.A. (2000). Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors. *Wat Sci Tech.* 41: 105-113.

Murakami S., Kodama N., Shinke R., Aoki K. (1997). Classification of catechol 1,2-dioxygenase family: sequence analysis of a gene for the catechol 1,2-dioxygenase showing high specificity for methylcatechol from Gram<sup>+</sup> aniline-asimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13. *Gene.* 185: 45-94.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of

polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 59: 695-700.

National Research Council (2007). The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial Planet. National Academic Press, Washington, DC, pp. 170.

Navari-Izzo F., Ricci F., Vazzana C., Quartacci M.F. (1995). Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: changes in lipids upon dehydration and rehydration. *Physiol Plant.* 94: 135-142.

Navari-Izzo F. and Rascio N. (1999). Plant response to water-deficit conditions. In Handbook of plant and crop stress, Pessarkli M. (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 231-270.

Neujahr H.Y. and Gaal A. (1973). Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur J Biochem.* 35: 386-400.

Neujahr H.Y. and Gaal A. (1975). Phenol hydroxylase from yeast. Sulphydryl groups in phenol hydroxylase from *Trichisporon cutaneum*. *Eur J Biochem.* 58: 351-357.

Ng L.C., Shingler V., Sze C.C., Poh C.L. (1994). Cloning and sequences of the first eight genes of the chromosomally encoded (methyl) phenol degradation pathway from *Pseudomonas putida* P35X. *Gene*. 151: 29-36.

Nurk A., Kasak L., Kivisaar M. (1991). Sequence of the gene (*pheA*) encoding phenol monooxygenase from *Pseudomonas* sp. EST1001: expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene*. 102: 13-18.

Oda Y., Slagman S-J., Meijer W.G., Forney L.J., Gottschal J.C. (2000). Influence of growth rate and starvation on fluorescent in situ hybridization of *Rhodopseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol Ecol*. 32: 205-213.

Okazaki T. and Okami Y. (1972). Studies on marine microorganisms. II. Actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. *J Antibiotics*. 25: 461-466.

Oliver M.J. (1996). Desiccation tolerance in vegetative plant cells. *Physiol Plant*. 97: 779-787.

Olsen G.J., Larsen N., Woese C.R. (1991). The ribosomal RNA database project. *Nucleic Acids Res*. 19: 2917-2021.

Ornston L.N. and Stanier R.Y. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to beta-ketoadipate by *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem*. 25: 3776-86.

Páca J. Jr., Kremláčková V., Turek M., Suchá V., Vilímková L., Páca J., Halecký M., Stiborová M. (2007). Isolation and partial characterization of cytoplasmic NADPH dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in *Candida tropicalis* yeast. *Enz Microbiol Tech.* 40: 919-926.

Pessione E., Divari S., Griva E, Cavaletto M., Rossi G.L, Gilardi G., Giunta C. (1999). Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. *Eur J Biochem.* 265: 549-555.

Peters M., Heinaru E., Talpsep E., Wand H., Stottmeister U., Heinaru A., Nurk A. (1997). Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, pheBA, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol.* 63: 4899-906.

Poulsen L.K., Licht T.R., Rang C., Kroghfelt K.A., Molin S. (1995). Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *J Bacteriol.* 177: 5840-5845.

Preston C.M. (2001). Carbon-13 solid-state NMR of soil organic matter - using the technique effectively. *Can J Soil Sci.* 81: 255-270.

Prosser J., Jansson J.K., Liu W-T. (2010). Nucleic-acid-based characterization of community structure and function. In *Environmental molecular microbiology*, Liu W.T. and Jansson J.K. (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 63-86.

Quartacci M.F., Glišić O., Stevanović B., Navari-Izzo F. (2002). Plasma membrane lipids in the resurrection plant *Ramonda serbica* following dehydration and rehydration. *J Exp Bot.* 53: 2159-2166.

Rasche F., Velvis H., Zachow C., Berg G., Van Elsas J.D., Sessitsch A. (2006). Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. *J Appl Ecol.* 43: 555-566.

Reardon K.F., Mosteller M.D., Rogers J.D.B. (2000). Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol Bioeng.* 69: 385-400.

Rehnstam A., Bäckman S.S., Smith D.C., Azam F., Hagström A. (1993). Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *Microbiol Ecol.* 102: 161-166.

Reysenbach A., Giver L.J., Wickham G.S., Pace N.R. (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3417-3418.

Rice-Evans C.A., Miller N. J., Paganga G. (1996). Structure-antioxydant activity relationship on flavonoids and phenolic acid. *Free Rad Biol Med.* 20: 933-956.

Rigo M. and Alegre R.M. (2004). Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from industrial wastewater and kinetics of the biodegradation. *Folia Microbiol.* 49: 41-45.

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., McNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 66: 2541-2547.

Saano A. and Lindstrom K. (1995). Small scale extraction of DNA from soil with spin column cleanup. In *Molecular microbial ecology manual*, Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D, De Bruijn F.J. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-6.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sandhu A., Halverson L.J., Beattie G.A. (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial community. *Microb Ecol.* 57: 276-285.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406-425.



Santos V.L. and Linardi V.R. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potential. *Proces Biochem.* 39: 1001-1006.

Schaechter M., Maaløe O., Kjeldgaard N.O. (1958). Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol.* 19: 592-606.

Schie P.M. and Young L.Y. (2000). Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. *Biorem J.* 4: 1-18.

Schleifer K.H. and Kandler O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 36: 143-147.

Schloss P.D. and Handelsman J. (2004). Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68: 686-691.

Schmid M., Schmitz-Esser S., Jetten M., Wagner M. (2001). 16-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection. *Environ Microbiol.* 3: 450-459.

Sei K., Asano K., Tateishi N., Mori K., Ike M., Fujita M. (1999). Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of

degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J Biosci Bioeng.* 88: 542–550.

Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U., Wilhelm E. (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 39: 23-32.

Sgherri C.L.M., Loggini B., Bochicchio A., Navari-Izzo F. (1994). Antioxidant system in *Boea hygroskopica*: changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry.* 37: 377-381.

Sgherri C., Stevanović B., Navari-Izzo F. (2000). Role of phenolic acids during dehydration and rehydration of *Ramonda serbica*. *Plant Physiol Biochem.* 38: 196.

Sgherri C., Cosi E., Navari-Izzo F. (2003). Phenols and antioxydative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol Plant.* 118: 21-28.

Sgherri C., Stevanović B., Navari-Izzo F. (2004). Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiol Plant.* 122: 478-485.

Shashirekha S., Uma L., Subramanian G. (1997). Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501. *J Indust Microbiol Biotechnol.* 19: 130-133.

Shingler V., Franklin C.H., Tsuda M., Holroyd D., Bagdasarian M. (1989). Molecular analysis of plasmid-encoded phenol hydroxylase from *Pseudomonas* CF600. *J Gen Microbiol.* 135: 1083-1092.

Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 16: 313-340.

Singh B.K., Campbell C.D., Sorenson S.J., Zhou J. (2009). Soil genomics. *Nat Rev Microbiol.* 7: 756-757.

Skoko N., Vujovic J., Savic M., Papic N., Vasiljevic B., Ljubijankic G. (2005). Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes. *J Microbiol Methods.* 61: 137-140.

Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol.* 67: 4742-4751.

Snyder L. and Champness W. (1997). Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington, D.C.

Sogin, M. L., Morrison H. G., Huber J. A., Welch D. M., Huse S. M., Neal P. R., Arrieta J. M., Herndi G. J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 12115-12120.

Stanley S. (1973). An ecological theory for the sudden origin of multicellular life in the late Precambrian. *Proc Natl Acad Sci USA*. 70: 1486-1489.

Stevanović B., Pham Thi A.T., Monteiro de Paula F., Vieira da Silva J. (1992). Effect of dehydration and rehydration on the polar lipid and fatty acid composition of *Ramonda* species. *Can J Bot*. 70: 107-113.

Stevanović V., Niketić M., Stevanović B. (1986). Sympatric area of the sibling and endemo-relict species *Ramonda serbica* Panč. and *R. nathaliae* Panč. & Petrov. (*Gesneriaceae*) in South Serbia (Yugoslavia). *Glasn Inst Bot*. 20: 45-54.

Strachan P.D., Freer A.A., Fewson C.A. (1998). purification and characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 and cloning and sequencing of its *catA* gene. *Biochem J*. 333: 741-747.

Suzuki K., Goodfellow M., O'Donnell A.G. (1993). Cell envelopes and classification. In Handbook of new bacterial systematics, Goodfellow M. and O'Donnell A.G. (Eds.), Academic Press, London, UK, pp. 195-250.

Takeo M., Maeda Y., Okada H., Miyama K., Mori K., Ike M., Fujita M. (1995). Molecular cloning and sequencing of the phenol hydroxylase gene from *Pseudomonas putida* BH. *J Ferment Bioeng.* 79: 485-488.

Takeo M., Nishimura M., Takahashi H., Kitamura C., Kato D.-I., Negoro S. (2007). Purification and characterization of alkylcatechol 2,3-dioxygenase from butylphenol degradation pathway of *Pseudomonas putida* MT4. *J Biosci Bioeng.* 104: 309-314.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.

Thompson J.R., Pachocha S., Pharino C., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Benoit J., Sarma-Rupavtarm R., Distel D.L., Polz M. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bakterioplankton population. *Science.* 307: 1311-1313.

Tindall B.J., Sikorski J., Smibert R.A., Krieg N.R. (2007). Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. In *Methods for general and molecular microbiology*, Reddy C.A., Beveridge T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., Snyder LR. (Eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp. 330-393.

Torsvik V., Gokskøyr J., Daae F.L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 56: 782-787.

Torsvik V., Øvreås L., Thingstad T. F. (2002) Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* 296: 1064 – 1066.

Tucić N. and Cvetković D. (2000). *Evoluciona biologija*, NNK International, Beograd, pp. 25-26.

van der Meer J.R. (1997). Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 71: 159–178.

Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60: 407-438.



Vilímková L., Páca J. Jr., Kremláčková V., Páca J., Stiborová M. (2008). Isolation of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase and catechol-1,2-dioxygenase from *Candida tropicalis* yeast. *Interdiscip Toxicol.* 1: 225-230.

Voet D. and Voet J.G. (1995). Enzyme kinetics. In Biochemistry, Rose N. (Ed.), John Wiley and Sons, Inc, New York.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H-P., Schleifer K-H. (1995). In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol.* 18: 251-264.

Wang G.C.-Y. and Wang Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology.* 142: 1107-1117.

Wang G.C.-Y. and Wang Y. (1997). Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbio.* 63: 4645-4650.

Wang Y.J., Xiao M., Cheng X.L., Liu J.Y., Chen J. (2007). Horizontal transfer of genetic determinants for degradation of phenol between the bacteria living in the plant and its rhizosphere. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77: 733-739.

Watanabe K., Teramoto M., Futamata H., Harayama S. (1998). Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 64: 4396-4402.

Wei G.H., Yu J.F., Zhu Y.H., Chen W.M., Wang L. (2008). Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. *J Hazard Mater.* 151: 111-117.

Weisburg W.G, Barns S.M, Pelletier D.A, Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.*173: 697-703.

Woese C.R., Kandler O., Whellis M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5476-4579.

Wolf Y.I., Rogozin I.B., Grishin N.V., Tatusov R.L., Koonin E.V. (2001). Genome trees constructed using five different approaches suggest new major bacterial clades. *BMC Evol Biol.* 1: 8.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33: 103-119.

Zahn J.A., DiSpirito A.A., Do Y.S., Brooks B.E., Cooper E.E., Hatfield J.L. (2001). Correlation of human olfactory responses to airborne concentrations of malodorous volatile organic compounds emitted from swine effluent. *J Environ Quality*. 30: 624-643.

Zaki S. (2006). Detection of *meta*- and *ortho*-cleavage dioxygenases in bacterial phenol degraders. *J Appl Sci Environ Manag*. 10: 75-81.