

# VPOGLED V AEROBNO MIKROBNO ZDRUŽBO REČNEGA SEDIMENTA KAMNIŠKE BISTRICE S KLASIČNIM GOJITVENIM IN MOLEKULARNO BIOLOŠKIM PRISTOPOM

Lijana FANEDL <sup>1</sup>

Delo je prispelo 01. decembra 2014, sprejeto 12. decembra 2014.  
Received December 01, 2014; accepted December 12, 2014.

## *Vpogled v aerobno mikrobno združbo rečnega sedimenta Kamniške Bistrice s klasičnim gojitvenim in molekularno biološkim pristopom*

Rečni sistemi so največkrat izpostavljeni antropogenim vplivom, ki vključujejo kemično onesnaženost in evtrofikacijo. Vse to povzroča spremembe tudi v strukturi in pestrosti mikrobnih združb v rečnem sedimentu. Namen študije je bil z gojitvenimi in molekularnimi metodami proučiti pestrost in strukturo mikrobne združbe sedimenta Kamniške Bistrice. Vzorce sedimenta smo odvzeli na treh mestih vzdolž toka reke: izvir (Kamniška Bistrica), srednji del (Vir) in spodnji del (Bišče) ter na terenu opravili osnovne fizikalno-kemijske analize. Čiste kulture smo iz sedimenta osamili in gojili na treh vrstah agarških gojišč (LB, NB in R<sub>2</sub>A) in jih mikro- in makromorfološko opisali. Iz čistih bakterijskih kultur in iz vzorcev sedimenta smo izolirali tudi genomsko DNAK. S širokospecifičnimi bakterijskimi začetnimi ologonukleotidi smo v reakciji PCR pomnožili ustrezne dele genov za 16S rRNA in jih analizirali z metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturanta (DGGE). Ugotovili smo, da je metoda DGGE primerna za proučevanje pestrosti celokupne mikrobne združbe rečnega sedimenta in omogoča ugotavljanje vplivov dejavnikov okolja na raznolikost mikrobne združbe. Profili analize DGGE mikrobnih združb so se med mesti vzorčenja razlikovali, medtem ko profili čistih kultur po pričakovanju niso predstavljali številčno pomembnejših bakterijskih populacij sedimenta. Na podlagi profilov DGGE smo izbrali 25 izolatov in za direktno sekvenciranje pripravili njihove pomnožke. Pridobljene sekvence dela gena za 16S rRNA smo z orodjem BLAST preliminarno taksonomsko uvrstili med skupine bakterij, ki so običajno prisotne v vodnih okoljih.

**Ključne besede:** mikrobiologija / aerobne bakterije / rečni sediment / gojitvene metode / molekularne metode / varstvo okolja / Slovenija

## *Insights into aerobic microbial community in the Kamniška Bistrica river sediment with culture-dependent and molecular biology approach*

River systems are exposed to anthropogenic disturbances, including chemical pollution and eutrophication. They may affect a structure and diversity of microbial communities in river sediment. The aim of the study was to describe diversity and structure of a bacterial community in the Kamniška Bistrica river sediment using culture-dependent and molecular methods. Sediment samples were collected from three sampling stations along the Kamniška Bistrica river: upstream (Kamniška Bistrica), midstream (Vir) and downstream (Bišče), and physico-chemical analysis was conducted on-site. Isolates were recovered from three different agar plate media (LB, NB in R<sub>2</sub>A) and micro- as well as macromorphologically described. DNA was extracted from pure cultures and directly from sediment samples, and 16S rRNA gene segments were PCR amplified using universal bacterial primers. The PCR products were subjected to denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that the DGGE was an appropriate method for monitoring the changes in the community structure of the river sediment and allows to determine the impact of environmental factors on bacterial diversity. The comparative analysis of the DGGE profiles from isolates and sediment samples showed that the DGGE banding patterns revealed different bacterial community structures for all three sampling stations, while the DGGE profiles of isolates did not represent dominant bacterial populations of the sediment. On the bases of the DGGE profiles, 25 isolates were chosen and their 16S rRNA genes were amplified and sequenced. All partial nucleotide sequences of 16S rRNA genes were preliminary taxonomically identified by using BLAST. The majority of sequenced isolates belonged to bacteria normally present in aquatic environments.

**Key words:** microbiology / aerobic bacteria / river sediment / culture-dependent methods / molecular methods / environment protection / Slovenia

<sup>1</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-mail: lijana.fanedl@bf.uni-lj.si

## 1 UVOD

V sedimentu, ki predstavlja zelo raznolik mikrobn habitat, imajo mikroorganizmi ključno vlogo pri izmenjavi hranil in energije, pri razgradnji organskega materiala in drugih kemičnih snovi pod vplivom kemijsko-fizikalnih lastnosti sedimenta in vodnega stolpca nad njim. Rečni sediment je neke vrste filter, v katerem se kopičijo težke kovine in druga onesnaževala, kar predstavlja potencialno možnost kopičenja le-teh vzdolž prehranjevalne verige tudi do najvišje trofične ravni – človeka. Učinkovitost razgradnje onesnaževal je odvisna tako od mikrobne aktivnosti in stresnih dejavnikov kot od koncentracije nakopičenih kemičnih onesnaževal. Na dejavnike stresa se mikrobna združba odzove s spremembami v sestavi, številčnosti in encimski aktivnosti. Zaradi tega so mikroorganizmi izvrstni kazalci stanja sedimenta ter pokazatelji morebitnih posledic za vodo (eutrofikacija) in atmosfero (toplogredni plini).

Danes številne molekularne metode omogočajo spremljanje dinamike mikrobnih skupin v kompleksnih vzorcih in sledenje premikom, odkrivanje in identifikacijo prevladujočih skupin, ki pa jih še ne znamo gojiti. Pri proučevanju strukture in raznolikosti mikrobnih združb različnih ekosistemov pogosto uporabljamo metodo gelske elektroforeze v gradientu denaturanta (DGGE) in metodo ugotavljanja profilov dolžin terminalnih restriksijskih fragmentov (T-RFLP) (Muyzer in sod., 1993; Marsh in sod., 2000). Metodi temeljita na pomnoževanju delov nukleinskih kislin (gen za 16S rRNA) v verižni reakciji s polimerazo (PCR) in z izbiro primernih začetnih oligonukleotidov lahko pomnožimo tudi sekvence, ki so v vzorcu prisotne v nizkem številu. Obe tipizacijski metodi sta sorazmerno hitri, vendar ne brez omejitev. Za razliko od DGGE, z analizo T-RFLP manj zanesljivo razlikujemo tesno sorodne sekvence, saj imajo take sekvence lahko enaka restriksijska mesta, kar posledično zmanjša število prepoznanih operacijskih taksonomskih enot (OTE) (Thiyagarajan in sod., 2010). Zaradi tega je metoda primernejša za primerjalno preučevanje pestrosti in dinamike mikrobnih združb ter ugotavljanje sezonskih in okoljskih vplivov na sestavo mikrobnih združb (Hullar in sod., 2006; Findlay, 2010). Pri metodi DGGE je analiza genetske pestrosti ekosistema in njena interpretacija ob pogojih ločevanja odvisna tudi od nastajanja artefaktov in od prednostnega pomnoževanja določenih tarč med reakcijo PCR, kar ob koncu pomeni večje število prepoznanih OTE (von Wintzigerode in sod., 1997; Polz in Cavanaugh, 1998; Speksnijder in sod., 2001). Sicer pa metodi predstavljata dober kompromis med filogenetsko ločljivostjo in analizo velikega števila okoljskih vzorcev. Prednost omenjenega pristopa pred sekvenčno analizo, ki omogoča večjo ločljivost, je možnost hitrega pregleda

velikega števila okoljskih vzorcev in s tem preliminarne analize.

Poznavanje sedimentov slovenskih rek je z mikrobiološkega tako kot fizikalno-kemijskega vidika pomanjkljivo. Izkušnje so pokazale, da je za realno oceno stanja rečnega ekosistema potreben celosten pristop k okoljskemu monitoringu, ki vključuje kemijski in biološki monitoring z uporabo niza biomarkerjev na različnih ravneh biološke organizacije. Poznavanje mikrobiote rečnih sedimentov bi pripomoglo k poznavanju dinamike procesov razgradnje organskih in drugih kemičnih snovi, ki so se skozi čas nakopičile v njem. V naši preliminarni raziskavi smo želeli z metodo DGGE ugotoviti pestrost mikrobne združbe sedimenta Kamniške Bistrice na treh lokacijah vzdolž rečnega toka in s tradicionalnimi gojitvenimi tehnikami izolirati aerobne predstavnik mikrobne združbe v zgornjih slojih sedimenta. Kamniška Bistrica zaradi hidrografskih značilnosti in močnih antropogenih vplivov v spodnjem delu toka predstavlja dober model za proučevanje rečnega sedimenta.

### 1.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI POREČJA KAMNIŠKE BISTRICE

Kamniška Bistrica spada v Posavsko porečje, ki s 53,1 % površine Slovenije predstavlja naše največje porečje. Reka Kamniška Bistrica izvira v kraških izvirih v Koncu pod Grintavci, na nadmorski višini 623 m, kamor pritekajo podzemne vode iz obsežnega grebena Kamniško-Savinjskih Alp in teče proti jugu prek Kamniškobistriške ravni. Porečje sestavljajo tri večja in več manjših porečij njenih pritokov v skupnem obsegu 534,4 km<sup>2</sup>. Večja porečja imajo Nevljica, Rača z Radomljo in Pšata, manjša pa Kamniška Bela, Korošica, Grohat, Bistričica in Črna. Dolžina Kamniške Bistrice od izvira ob vnožju Kamniško-Savinjskih Alp do izliva v Savo pod Beričevim znaša 32,8 km. Na izlivu znaša povprečni pretok reke 20,9 m<sup>3</sup>/s (Globevnik, 2002). Posebnost porečja je zelo visoka reliefna amplituda, ki znaša 1986 m. Za zgornji tok reke je značilen velik strmec, kar se kaže v veliki erozijski moči vodnega toka in koritasto izoblikovani strugi. Na odseku od Stahovice do Kamnika se strmec toka izrazito zmanjša, opazno je tudi intenzivno odlaganje rečnega materiala (Brečko Grubar, 2007). Pretočne vrednosti reke v zgornjem toku kažejo na snežno-dežni pretočni režim, kar pomeni, da ima največji pretok od marca do julija ter v oktobru in novembru, najnižjega pa od decembra do februarja ter poleti v avgustu in septembru (arhiv ARSO). Od Kamnika do izliva v reko Savo je struga Kamniške Bistrice zelo široka in ob nizkem vodostaju vodni tok ni enakomeren, kar je posledica preteklih regulacij struge, odvzema rečne vode za Homško in Radomeljsko

mlinščico in iztekanje vode v podzemni vodonosnik. Od Kamnika navzdol snežno-dežni režim vedno bolj prehaja v dežno-snežni režim. K nižjemu poletnemu vodostaju prispevajo visoke temperature in posledično večje izhlapevanje vode, poleg tega veliko vode porabi tudi okoliško rastlinstvo. V pozno poletnih in zgodnje jesenskih tednih je pogosto kritično nizek pretok reke na odseku med Kamnikom in Domžalami, kar v izrednih razmerah vodi k popolni presušitvi struge. Bogataj (2009) v svoji študiji opozarja na nujen ostrejši nadzor nad odvzemom vode iz glavne struge za obe mlinščici v času nizkih vodostajev.

V zgornjem delu porečja Kamniške Bistrice prevladujejo karbonatne kamnine, apnenec in triasni dolomit. Južno od Kamnika prevladujejo različno zrnate sedimentne kamnine, ki jih je odložila reka s pritoki. Večinoma so dobro prepustne in porozne, kar je pomembno za nastanek zalog podtalnice. Najbogatejši viri podzemnih voda v porečju Kamniške Bistrice so večinoma zajeti. V zgornjem delu porečja se nahaja vodni vir nad Stahovico in na območju Krvavca. Nižje vodovodni sistem Domžale napaja podzemna voda iz razpoklinskega vodonosnika na območju Kolovca, v spodnjem delu porečja pa zajeta podtalnica na Kamniško-Domžalski ravnini in podzemna voda iz razpoklinskega vodonosnika pod prodnim vodonosnikom (Brečko Grubar, 2007).

Po značaju sodi Kamniška Bistrica med bolj urbanizirane reke v Sloveniji, zato je antropogeni vpliv izredno velik. Na podlagi upoštevanja antropogenih vplivov na podzemne vode je porečje ocenjeno z zelo visoko oceno tveganja (Strokovne..., 2002). Pokrajinska raba je v primerjavi z goratim delom porečja bolj intenzivna, kar povečuje njeno izpostavljenost onesnaženju in spreminjanju hidrografskih značilnosti. Danes je reka v spodnjem toku predvsem prejemnik ne zajetih in delno očiščenih odpadnih vod večine prebivalstva in industrijsko-obrtnih dejavnosti na področju Kamnika, Mengša, Domžal in Trzina ter prejemnik kmetijskih odplak. V preteklosti največja onesnaževalca Kamniške Bistrice, nekdanja Papirnica Količevo (danes podjetje Količevo Karton d.o.o.) in Farma Ihan d.d., čistita svoje odpadke na biološki čistilni napravi. V podjetju Količevo Karton d.o.o. so v letu 2005 obstoječo aerobno čistilno napravo nadgradili z anaerobnim delom in s tem zadovoljili zakonskim določilom obremenitve Kamniške Bistrice in mlinščice z izpusti. Farma Ihan d.d. čisti gnojevko na Bioplinarni Ihan (Petrol d.d.) in med anaerobno razgradnjo nastali bioplin izkorišča za proizvodnjo električne in toplotne energije. Med anaerobnim procesom čiščenja se količine hranil, kot sta dušik in fosfor, bistveno ne zmanjšajo, zato so bioplinsko čistilno napravo v letu 2007 dogradili s stopnjo za odstranjevanje hranil iz odpadne vode (predvsem dušika in fosforja), kar jim je leta 2009 omogočilo direktno priključitev na Centralno čistilno napravo Domžale-Ka-

mnik d.o.o. S tem posegom so Kamniško Bistrico močno razbremenili dodatnega vnosa hranil in občasnega organskega onesnaženja, do katerega je v preteklih letih prihajalo zaradi sanacije tehnološkega procesa. Na biološko in kemijsko stanje Kamniške Bistrice ima v spodnjem toku velik vpliv tudi Centralna čistilna naprava Domžale-Kamnik d.o.o. (CČN), ki čisti komunalne, industrijske, deponijske in padavinske odpadne vode iz občin Domžale, Kamnik, Mengeš in Trzin. Učinek čiščenja CČN je več kot 90 % po organski obremenitvi. Iz podatkov obratovalnega monitoringa (ZZV Kranj) in podatkov CČN je razvidno, da v zadnjih letih parametra, kot sta KPK in BPK5, na iztoku nista bila presežena. Ker CČN ni bila projektirana za odstranjevanje dušika (nima terciarnega čiščenja), je iztok večinoma obremenjen s prekomernimi koncentracijami amonijskega in posledično skupnega dušika (23–27 mg/L) (Poročilo o delu...2007, 2008, 2009, www.ccn-domzale.si). Z rekonstrukcijo CČN po 22. 8. 2016 ne bo več presegala zakonodajno predpisanih vrednosti skupnega dušika (<10 mg/L) in fosforja (<1 mg/L).

Intenzivna raba zemljišč na Kamniškobistriški ravnini je predvsem vzrok onesnaženosti podtalnice, ki je pred vplivi s površja slabo zavarovana in v spodnjem delu toka plitvo pod površjem. Večina črpališč pitne vode je prav pod kmetijskimi zemljišči, na katerih se intenzivno gnojijo z naravnimi in umetnimi gnojili ter se uporablja fitofarmacevtska sredstva. Po Odloku o območjih vodonosnikov in njihovih hidrografskih zaledij, ogroženih zaradi fitofarmacevtskih sredstev (Ur.L. RS št. 97/2002), ima dolina Kamniške Bistrice namreč status ogroženega območja zaradi herbicida atrazina. Iz Poročil o kakovosti pitne vode iz vodooskrbnih sistemov v Domžalah je razvidno, da je desetilatrazin, razgradnji produkt atrazina, stalno prisoten. Koncentracije desetilatrazina so bile do 2010 na meji dovoljenih koncentracij, oziroma so bile na določenih črpališčih občasno celo presežene (Letno poročilo..., 2006,2007; Poročilo o kakovosti pitne vode..., 2008, 2009). Po letu 2010 so se njegove vrednosti znižale. Na nekaterih črpališčih so presežene vrednosti metolaklor, ki je aktivna snov herbicidov za zatiranje enoletnih ozko in širokolistnih plevelov (Poročilo o pitni vodi..., 2010).

## 1.2 EKOLOŠKO IN KEMIJSKO STANJE KAMNIŠKE BISTRICE

V Sloveniji poteka program monitoringa kakovosti površinskih voda v skladu z zahtevami vodne direktive od leta 2007. Za površinske vode se določa ekološko in kemijsko stanje. Kemijsko stanje površinskih voda se na podlagi izračuna letnih povprečnih vrednosti koncentracij prednostno nevarnih snovi (Direktiva..., 2008/105/

**Preglednica 1:** Ocena kemijskega in ekološkega stanja reke Kamniška Bistrica v letu 2010**Table 1:** Assessment of the chemical and ecological status of the Kamniška Bistrica river in 2010

Vzorčno mesto	Ekološko stanje									
	Kemijsko stanje		Saprobnost			Trofičnost		Hidromorfološka spremenjenost		Posebna onesnaževala
	Ocena	Raven zaupanja ocene	Bentoški nevretenčarji	Fitobentos in makrofiti	BPK5	Fitobentos in makrofiti	NO <sub>3</sub>	Bentoški nevretenčarji		
Izvir	dobro	visoka	-	-	-	-	-	-	-	
Ihan	dobro	visoka	dobro	zelo dobro	zelo dobro	zelo dobro	zmerno	zmerno	dobro	
Beričevo	dobro	srednja	dobro	dobro	dobro	zelo dobro	zmerno	slabo	dobro	

Vir: Ocena stanja rek..., 2012

ES) razvršča v dva razreda kakovosti: dobro ali slabo. Ekološko stanje površinskih voda se razvršča na osnovi bioloških elementov kakovosti, splošnih fizikalno-kemijskih parametrov in posebnih onesnaževal v pet razredov kakovosti: zelo dobro, dobro, zmerno, slabo in zelo slabo (Ur.l. RS 14/09, 98/10). Kamniška Bistrica je v dobrem kemijskem in ekološkem stanju (pregl. 1). V spodnjem toku pa je že daljše obdobje eden bolj obremenjenih vodotokov v Sloveniji. Onesnaženje rečne vode z organskimi snovmi v glavnem povzročajo izpusti iz komunalnih

in industrijskih odpadnih voda ter spiranje s kmetijskih površin predvsem zaradi neustreznega gnojenja in uporabe fitofarmaceutskih sredstev. Vrednosti nitrata se gibljejo okoli 10 mg NO<sub>3</sub>/L (mejna vrednost 25 mg/L), kar razvršča reko v zmeren kakovostni razred glede na vsebnost nitrata. Koncentracije pesticidov so pod največjimi dovoljenimi koncentracijami. K slabšemu ekološkemu stanju prispeva hidromorfološka spremenjenost in splošna degradiranost struge in bregov.

Spremembe rečnega profila, globine in širine struge, strukture dna, bregov, brežin in obrežne vegetacije zelo vplivajo na spremembo kakovosti življenjskih prostorov. Leta 2006 je bila v monitoring kakovosti površinskih vod vključena tudi analiza rečnega sedimenta. Na odvzemnem mestu Beričevo koncentracije kovin v sedimentu niso presegle mejnih vrednosti (Monitoring..., 2008). Iz pregleda poročil o kakovosti vodotokov v Sloveniji je od leta 2006 opazen jasen trend izboljšanja, predvsem kemijskega stanja Kamniške Bistrice (Ocena stanja rek..., 2010, 2012).

## 2 MATERIAL IN METODE

### 2.1 VZORČENJE

Vzdolž rečne struge Kamniške Bistrice smo opravili vzorčenje na treh lokacijah: na izviro pred jezerom v Kamniški Bistrici (odvzemno mesto A: 46°19'39"N 14°35'24"E), med Virom in Rodico za mostom za pešce (odvzemno mesto B: 46°9'0"N 14°35'24"E) in v spodnjem delu toka za mostom v Bišču (odvzemno mesto C: 46°1'14"N 14°37'0"E) (slika 1). Plast sedimenta v strugi je bila nizka, zato smo sediment vzorčili s pomočjo žlic do največje globine 5 cm. Na vsaki lokaciji smo odvzeli 3 vzorce sedimenta in ohlajene do analize hranili v centrifugirnih Falcon.



**Slika 1:** Prikaz toka Kamniške Bistrice in lokacij vzorčenja  
**Figure 1:** Flow of the Kamniška Bistrica river and locations of sampling



## 2.2 DOLOČANJE TEKSTURE IN FIZIKALNO KEMIJSKIH LASTNOSTI SEDIMENTA

Sediment sestavljajo mineralni delci različnih velikosti in organska snov. Fizikalno-kemijske lastnosti sedimenta so odvisne od specifične površine delcev, kar pa posredno vpliva tudi na biološke lastnosti sedimenta. Zato je za poznavanje lastnosti sedimenta pomembno določanje deležev posameznih velikostnih frakcij. Vzorcem smo teksturo sedimenta določili s sedimentacijsko metodo s pipetiranjem (Hodnik, 1988). Po izračunu deležev posameznih frakcij smo za ugotavljanje teksture uporabili ameriško klasifikacijo (USDA), ki s pomočjo teksturnega trikotnika razvrsti tla oz. sediment v 12 razredov.

Na mestih vzorčenja smo s klasičnim termometrom izmerili temperaturo zraka, vode in sedimenta. S pomočjo multimetra MultiLine P4 (WTW, Nemčija) smo z elektrodo SenTix 41 izmerili pH, s sondo SelOx 325 raztopljeni kisik in s standardno celico TetraCon 325 še prevodnost. Med vzorčenjem smo določili tudi barvo in vonj sedimenta.

## 2.3 PRIPRAVA GOJIŠČ IN IZOLACIJA AEROBNIH BAKTERIJ

Za izolacijo čistih bakterijskih sevov iz rečnega sedimenta smo uporabili tri vrste mikrobioloških agar-skih gojišč: splošno gojišče LB (Luria-Bertani), 100-krat redčen nutrient agar NB (Biolife, Italija) in gojišče R<sub>2</sub>A (Edwards in sod., 2006) z dodatkom 0,03 % glicina. Najprej smo v sterilne Falcon centrifugirke zatehtali 5 g sedimenta, dodali 5 g sterilne fiziološke raztopine in vzorce trikrat dobro premešali na vorteks mešalu. Za vse tri ponovitve posameznih vzorcev smo pripravili 10-kratne redčitvene vrste s fiziološko raztopino in 100 µl posamezne redčitve (do 10<sup>-3</sup>) konfluentno nacepili na vse tri vrste pripravljenih agar-skih gojišč. Po enotedenski inkubaciji agar-skih plošč pri 20 °C smo prešteli število zraslih kolonij, izračunali število kolonijskih enot na gram sedimenta (CFU/g) in zapisali morfološke značilnosti mikrobnih kolonij. S števnih agar-skih plošč smo izbrali različne morfološke tipe kolonij in jih s tehniko precepljanja do posameznih kolonij precepili na ustrezna sveža agarska gojišča. Med postopkom čiščenja sevov smo čistost preverjali z gramskim barvanjem in pregledovanjem obarvanih sevov pod mikroskopom (Olympus 50CH). Čiste seve smo shranjevali na ustreznih poševnih agar-skih gojiščih v epruvetah (t.i. poševniki) pri 4 °C.

## 2.4 IZOLACIJA DNA

Izolacijo skupne mikrobne DNA sedimenta smo izvedli s kompletom UltraClean™ Soil Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc., ZDA) po navodilih proizvajalca. Predhodno smo vzorcem sedimenta iz treh odzemnih mest odstranili odvečno tekočino s kratkim centrifugiranjem na 10.000 x g. Za izolacijo skupne DNA (vzorci A, B, C) smo uporabili 1 g centrifugiranega sedimenta. Iz čistih sevov, izoliranih iz sedimenta, smo izolirali DNA s kompletom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, ZDA). Po izolaciji smo mikrobno DNA preverili s horizontalno agarozno gelsko elektroforezo v 0,5 x TBE pufu. 0,8 % agarozne gele smo barvali v raztopini etidijevga bromida (1 µg/ml) in jih pregledovali z UV transiluminatorjem GelDoc 1000 (Bio-Rad, ZDA).

## 2.5 DGGE

Za analizo DGGE smo pripravili pomnožke PCR s parom začetnih oligonukleotidov F968-gc in R1401 (Nübel in sod., 1996). V 0,2 ml mikrocentrifugirkih (Brand, Namčija) smo pripravljali 20 µl reakcijske mešanice, ki so vsebovale naslednje reagente: 2 µl 10-kratnega *Taq* pufra; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov (dNTP) (vse Fermentas, Litva); 0,25 µM posameznega začetnega oligonukleotida; 0,6 enote *Taq* DNA polimeraze (Fermentas, Litva) in 1 µl matrične DNA. Tarčne dele genov za 16S rRNA smo pomnoževali v cikličnem termostatu My Cycler™ (Bio-Rad, ZDA). Reakcija PCR je potekala po naslednji temperaturni shemi: 3 min. začetni denaturaciji DNA pri 95 °C je sledilo 35 ciklov (30 sek. denaturacija pri 95 °C, 30 sek. prileganje začetnih oligonukleotidov pri 56 °C, 80 sek. podaljševanje pri 72 °C) in 10 min. podaljševanje pri 72 °C. Pomnožke PCR smo ločevali v gradientnih gelih z elektroforetskim sistemom D GENE™ (Bio-Rad, ZDA). Gradientni geli so vsebovali 8 % akrilamida (akrilamid/*bis*-akrilamid 37,5:1) in vzdolž gela naraščajočo koncentracijo denaturanta (formamid in urea) od 40 % do 60 %. Elektroforeza je tekla 17 ur v enkratnem TAE pufu pri 60 °C in 75 V. Po končani elektroforezi smo gele barvali 30 min v enkratni TAE raztopini SYBR Gold barvila (Invitrogene Molecular Probes, ZDA) ter jih slikali s sistemom za analizo slike ChemiGenius2 (Syngene, Velika Britanija).

## 2.6 PCR ČISTIH SEVOV, SEKVENCIRANJE IN ANALIZA SEKVENC

Za sekvenciranje smo izbrali DNA nekaterih čistih sevov glede na položaj proge na DGGE gelu in mesto

vzorčenja. Ustrezno redčeno bakterijsko DNA izbranih čistih sevov smo najprej uporabili za pomnoževanje v reakciji PCR z bakterijskim univerzalnim parom začetnih oligonukleotidov fd1 (Weisburg in sod, 1991) in 1392R (Lane, 1991). Posamezna 20 µl reakcijska mešanica je vsebovala 2 µl 10-kratnega *Taq* pufra; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov (vse Fermentas, Litva); 0,4 µM posameznega začetnega oligonukleotida; 0,6 enote *Taq* DNA polimeraze (Fermentas, Litva) in 1 µl matrične DNA. Izbrane pomnožke smo očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca in jih poslali sekvencirati v center Macrogen Inc. (Koreja). Sekvenciranje je potekalo enostransko z začetnim oligonukleotidom 27F (Macrogen Inc., Koreja). Pridobljene sekvence smo pregledali in obdelali s programom Chromas v. 1.41 (McCarthy C., 1996–1997, Griffith University, Avstralija) in jih z iskalnim algoritmom *blastn* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) v 16s rRNA podatkovnih bazah skušali identificirati ali jim poiskati najbolj podobne sekvence.

### 3 REZULTATI IN DISKUSIJA

Na odvzemnih mestih A, B in C smo v času vzorčenja izmerili temperaturo zraka, vode in sedimenta, pH, koli-

čino raztopljenega kisika in prevodnost rečne vode (pregl. 2).

Z indirektno gojitveno tehniko smo ugotovili naraščanje števila bakterij v sedimentu vzdolž Kamniške Bistrice (pregl. 3). V spodnjem toku reke povečana količina organskih snovi sedimentnim mikroorganizmom zagotavlja večjo količino hranil in s tem ugodnejše pogoje rasti. Za izolacijo in gojenje sevov smo uporabili tri različne vrste gojišč, dva osnovna mikrobiološka gojišča (LB, NB) in gojišče R<sub>2</sub>A, ki se pogosto uporablja za izolacijo vodnih mikroorganizmov. S takšnim izborom smo poskušali izolirati čim širšo populacijo aerobnih bakterij iz vzorcev sedimenta. Iz preglednice 4 je razvidno, da smo na redčenem gojišču NB in gojišču R<sub>2</sub>A uspeli izolirati večje število bakterij kot na gojišču LB.

Pri samem gojenju izolatov smo naleteli na težave, kot je soodvisnost nekaterih vrst, kar pomeni nezmožnost rasti določene vrste v odsotnosti druge vrste. Pri nekaterih sevih smo z vsakim precepljanjem opazili manjše kolonije, kar je vodilo v izgubo sevov. Hitro rastoči sevi so pogosto prerasli majhne, počasi rastoče kolonije in s svojo agresivno rastjo prispevali k dodatni izgubi sevov. Čistost izolatov smo preverjali z barvanjem po Gramu in mikroskopsko analizo. Glede na makromorfološke lastnosti bakterijskih kolonij med posameznimi odvzemnimi mesti (A, B, C) nismo opazili bistvenih razlik. S pregledovanjem mikroskopskih preparatov izoliranih sevov smo ugotovili, da je

**Preglednica 2:** Osnovni fizikalno-kemijski parametri zraka, rečne vode in sedimenta (19.10.2010)

**Table 2:** The basic physico-chemical parameters of air, river water and sediment (19.10.2010)

Parametri	Odvzemno mesto A (izvir)	Odvzemno mesto B (Vir)	Odvzemno mesto C (Bišče)
Temperatura zraka [°C]	6	8	8,5
Temperatura rečne vode [°C]	5	9	11,3
Temperatura sedimenta [°C]	5,2	8,7	10,4
pH rečne vode	8,08	8,4	7,57
pH sedimenta	7,8	8,12	7,29
Raztopljeni kisik [mg O <sub>2</sub> /L]	11,5	10,6	9,6
Prevodnost [µS/cm]	174	412	529
Vodostaj [cm]	53 <sup>a</sup>	114 <sup>a</sup>	ni meritve <sup>b</sup>
Pretok [m <sup>3</sup> /s]	0,90 <sup>a</sup>	0,662 <sup>a</sup>	ni meritve <sup>b</sup>
KPK (12.10.2010) [mg O <sub>2</sub> /L]	ni meritve	ni meritve	<5 <sup>a</sup>
BPK (12.10.2010) [mg O <sub>2</sub> /L]	ni meritve	ni meritve	0,7 <sup>a</sup>
TOC (12.10.2010) [mg C/L]	ni meritve	ni meritve	1,1 <sup>a</sup>
Vonj sedimenta	po zemlji	neizrazit	rahlo po gnojevki
Barva sedimenta	svetlo rjav	sivo rjav	sivo-zeleno-črn
Tekstura sedimenta	peščena ilovica	ilovnat pesek	ilovnat pesek

<sup>a</sup> podatki, pridobljeni iz arhiva Agencije Republike Slovenije za Okolje

<sup>b</sup> na vodomerni postaji Beričevo že od leta 1989 ne izvajajo hidrometričnih meritev

**Preglednica 3:** Število kolonijskih enot na gram vzorca sedimenta  
**Table 3:** Number of colony forming units per gram of river sediment

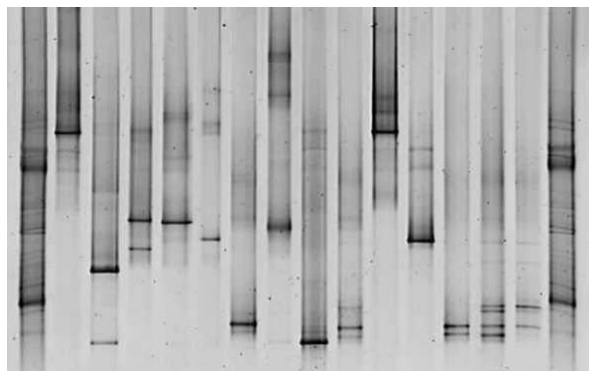
Vzorec	Gojišče		
	LB	NB	R <sub>2</sub> A
A1	7,6 · 10 <sup>4</sup>	4,2 · 10 <sup>5</sup>	3,7 · 10 <sup>5</sup>
A2	8,8 · 10 <sup>4</sup>	3,9 · 10 <sup>5</sup>	3,3 · 10 <sup>5</sup>
A3	1,2 · 10 <sup>5</sup>	4,3 · 10 <sup>5</sup>	2,5 · 10 <sup>5</sup>
Povprečje A	9,5 · 10 <sup>4</sup>	4,1 · 10 <sup>5</sup>	3,2 · 10 <sup>5</sup>
B1	3,6 · 10 <sup>5</sup>	1,5 · 10 <sup>6</sup>	1,5 · 10 <sup>6</sup>
B2	2,2 · 10 <sup>5</sup>	6,1 · 10 <sup>5</sup>	8,2 · 10 <sup>5</sup>
B3	2,9 · 10 <sup>5</sup>	1,4 · 10 <sup>6</sup>	1,6 · 10 <sup>6</sup>
Povprečje B	2,9 · 10 <sup>5</sup>	1,2 · 10 <sup>6</sup>	1,3 · 10 <sup>6</sup>
C1	3,4 · 10 <sup>6</sup>	N	N
C2	2,6 · 10 <sup>6</sup>	N	N
C3	2,1 · 10 <sup>6</sup>	N	N
Povprečje C	2,7 · 10 <sup>6</sup>	N	N

N = pri redčitvi 10<sup>-3</sup> neštevno število kolonijskih enot

na gojiščih LB in NB prevladovalo večje število po Gramu pozitivnih sevov, medtem ko je bilo na gojišču R<sub>2</sub>A število po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih sevov bolj uravnoteženo.

Na gojiščih NB so izrazito prevladovale kokoidne oblike bakterijskih celic, na gojiščih R<sub>2</sub>A pa paličaste oblike. Omenjene ugotovitve jasno potrjujejo znana dejstva o selekcijskem vplivu sestave gojišč na pestrost izoliranih bakterijskih sevov. Izbrana gojišča vsekakor ne ustrezajo celotni prehransko zahtevni sedimentni združbi, zato smo na omenjenih gojiščih izolirali le majhen delež aerobne združbe. Pri ekoloških vzorcih predstavlja nepoznavanje

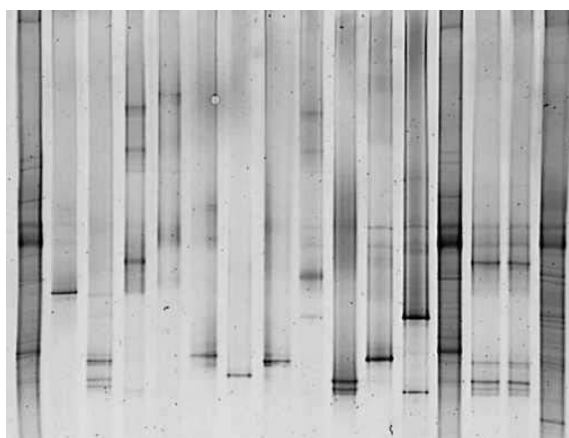
C MZ3 MB2 NP4 TD3 NP2 TD1 MZ2 AS3 NP3 LS1 MN2 MZ7 SM6 MZ4 C



**Slika 2:** DGGE elektroforetska ločitev pomnožkov PCR dela 16S rRNA gena iz vzorca sedimenta C in čistih sevov, izoliranih iz vzorca sedimenta na odvzemnem mestu C

**Figure 2:** The DGGE profiles of the PCR amplified 16S rRNA gene segments from DNA extracted from sediment samples C and pure strains isolated from a sample of sediment C

C NP6 MZ5 MB1 LS2 TD2 TD5 LS6 LS3 MM2 MM3 MM4 C MD2 BN1 A



**Slika 3:** DGGE elektroforetska ločitev pomnožkov PCR dela 16S rRNA gena iz vzorcev sedimenta A in C, čistih sevov, izoliranih iz vzorca sedimenta C in dveh sevov (JR5, JR6) izoliranih iz vzorca sedimenta A

**Figure 3:** The DGGE profiles of the PCR amplified 16S rRNA gene segments from DNA extracted from sediment samples A and C, pure strains isolated from a sample of sediment C and two strains (MD2, BN1) isolated from a sample of sediment A

rastnih razmer mikroorganizmov posebej veliko omejitev. Nekateri avtorji navajajo, da z gojitvenimi tehnikami uspešno izolirati približno 1 % celotne združbe. Na gojiščih v vidne kolonije običajno zraste celo manj kot odstotek vseh mikroorganizmov, kar imenujemo fenomen anomalije števnih plošč (Staley in Konopka, 1985; Spring in sod., 2000). Zaradi podcenjene dejanske mikrobne populacije moramo tradicionalne mikrobiološke tehnike dopolniti s sodobnimi molekularnimi metodami, ki so neodvisne od izolacije in gojenja mikroorganizmov.

V naši preliminarni raziskavi smo kot tipizacijsko tehniko za ugotavljanje raznolikosti sedimentne mikrobne združbe uporabili metodo DGGE (slika 2). V reakciji PCR smo s specifičnimi pari začetnih oligonukleotidov za bakterije (F968-gc in R1401) pomnožili dele 16S rRNA genov iz treh vzorcev sedimenta in 45 izbranih vzorcev čistih bakterijskih sevov ter pomnožke analizirali z DGGE elektroforezo. Profili med vsemi tremi odvzemnimi mesti se jasno razlikujejo. Na sliki 3 so opazne razlike v DGGE profilih mikrobne združbe iz odvzemnega mesta A in C. Profil vzorcev odvzemnega mesta B ni prikazan, a se loči od profila A in B. Vsi profili so kompleksni, z večjim številom močnejših in šibkejših prog. Med profili vzorcev A, B in C smo opazili le dve močnejši prog, kjer so se pomnožki PCR pri vseh treh vzorcih v gelu ustavili na enakih mestih. Močnejše proge načeloma predstavljajo številčnejšo populacijo določene združbe v vzorcu.

Poleg pestrosti sedimentne združbe smo z analizo želeli ugotoviti, ali smo s klasično gojitveno metodo uspeli

**Preglednica 4:** Pregled sekvenc identificiranih bakterijskih sevov in njihove morfološke lastnosti  
**Table 4:** Overview of bacterial sequences identified in this study and morphology of isolated strains

Oznaka seva	Rod	Odstotek podobnosti	Morfološke značilnosti	Habitat
<b>Odvzemno mesto A</b>				
BB5	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	Gram– palčke, gibljive, nesporogene	talna in vodna okolja
BB2	<i>Pseudomonas</i> sp.	98	Gram– palčke, gibljive, nesporogene	talna in vodna okolja
BB4 TZ4	<i>Flavobacterium</i> sp.	99	Gram– palčke, gibljive, oportunistični patogeni, tvorijo rumeni pigment	talna in vodna okolja
TZ2	<i>Acinetobacter</i> sp.	98	Gram– palčke, negibljive	talna in vodna okolja
MD2	<i>Pedobacter</i> sp.	98	Gram– palčke, negibljive, nesporogene, tvorijo rumeni pigment	pretežno talna okolja, pitna voda
<b>Odvzemno mesto B</b>				
DZ1 KV2 MP2	<i>Pseudomonas</i> sp.	98–99	Gram– palčke, gibljive, nesporogene	talna in vodna okolja
MK1	<i>Citrobacter</i>	98	Gram– palčke, koliformna	talna in vodna okolja, odpadne vode, prebavila
DL6	<i>Arthrobacter</i> sp.	97	Gram variabilne, pleomorfne oblike (palčke, koki)	pretežno v tleh
MP5	<i>Janthinobacterium</i> sp.	98	Gram– palčke, gibljive, kemoorganotrofne, tvorijo vijolični pigment violacein	talna in vodna okolja
<b>Odvzemno mesto C</b>				
TĐ1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98	Gram– palčke, gibljive, nesporogene, tvori zeleni fluorescentni pigment	talna in vodna okolja, listi in korenine rastlin
MZ7 LS6	<i>Pseudomonas</i> sp.	89–98	Gram– palčke, gibljive, nesporogene	talna in vodna okolja
NP3 SM6	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	Gram+ palčke, gibljive, sporogene	talna okolja
NP6	<i>Shewanella</i> sp.	98	Gram– palčke, fakultativni anaerob, proizvaja H <sub>2</sub> S	sladke in slane vode, sediment, odpadne vode
AS3	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gram– palčke, fakultativni anaerob, enterobakterija	voda, sediment
MN2	<i>Duganella zoogloeoide</i>	98	Gram– rahlo ukrivljene palčke, nesporogena, kemoorganotrofne	onesnažena vodna okolja, aktivno blato
MB1	<i>Janthinobacterium lividum</i>	99	Gram– ravne do rahlo ukrivljene palčke, gibljive, kemoorganotrofne, tvorijo vijolični pigment violacein (Pantanella in sod., 2007)	talna in vodna okolja
LS3	<i>Janthinobacterium</i> sp.	98		
MZ3	<i>Citrobacter freundii</i>	96	Gram– palčke, koliformna	talna in vodna okolja, odpadne vode, prebavila
TĐ3	<i>Acinetobacter A. junii</i>	98 99	Gram– palčke, negibljive	talna in vodna okolja
MB2	<i>Aeromonas</i>	99	Gram– palčke, gibljive, nesporogena, patogena predvsem za vodne živali	sladke in slane vode, onesnaženi vodni viri



izolirati seve, ki predstavljajo katero od močnejše zastopanih populacij v preučevanih sedimentnih vzorcih. Med 45 izbranimi sevi za analizo DGGE nismo na gelu pri nobenem izmed sevov zaznali proge, ki bi bila na enakem mestu tudi v profilu pripadajočega sedimentnega vzorca, oziroma so bile proge zelo šibke, kar je onemogočalo natančnejšo primerjavo. To znova potrjuje dejstvo, da smo iz sedimenta izolirali le majhen delež bakterij, ki so najverjetneje maloštevilno zastopane v njem in jih je enostavno gojiti. Za dokončen odgovor, katere populacije bakterij predstavljajo posamezne proge, bi morali iz DGGE gelov izrezati posamezne proge, jih klonirati in sekvencirati ter sekvence identificirati, kar pa v naši preliminarni študiji ni bil predmet proučevanja.

Na podlagi analize DGGE smo izbrali 25 sevov in za direktno sekvenciranje pripravili njihove pomnožke. Pridobljene sekvence dela gena za 16S rRNA smo z orodjem BLAST preliminarno taksonomsko uvrstili (pregl. 4).

Iz treh odvzemnih mest zgornjega sloja sedimenta Kamniške Bistrice nam je uspelo izolirati majhen delež bakterijske združbe. Izolirali smo predvsem za gojenje enostavne bakterije, ki so običajno prisotne v vodnih okoljih. Iz sedimenta odvzemnega mesta C smo izolirali predstavnike bakterijskih rodov, ki so prisotni v bolj onesnaženih vodnih okoljih (*Shewanella*, *Duganella*, *Citrobacter*, *Aeromonas*...). Podobno tudi drugi avtorji poročajo, da so v sedimentnih vzorcih rečnih sistemov z gojitvenimi tehnikami v zgornjem sloju sedimenta izolirali heterotrofne predstavnike predvsem iz rodov *Bacillus* (Atlas in Bartha, 1998; Nealson, 1997), *Pseudomonas* (Nealson, 1997), *Achromobacter* in *Flavobacterium* (Litchfield in Floodgate, 1975) med kemolitotrofi pa npr. *Ralstonia eutropha*, *Paracoccus denitrificans*, *Shewanella putrefaciens* (Nealson, 1997; 2006).

#### 4 ZAKLJUČKI

Za izolacijo anaerobnih bakterij smo uporabili tri različna mikrobiološka gojišča. Na redčenem gojišču NB in gojišču R<sub>2</sub>A smo izolirali večje število bakterij kot na gojišču LB. Na gojiščih NB so prevladovali kokoidne oblike bakterijskih celic, na gojiščih R<sub>2</sub>A pa paličaste oblike. Na gojišču R<sub>2</sub>A je bilo število po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih sevov uravnoteženo. Pričakovano smo v sedimentu odvzemnega mesta C ugotovili večje število kolonijskih enot na gram sedimenta kot na mestih A in B.

Med vsemi tremi proučevanimi vzorci sedimenta, odvzetimi vzdolž toka Kamniške Bistrice, smo z metodo DGGE ugotovili razlike v kompleksnosti sedimentne mikrobne združbe.

Primerjave med profili analize DGGE in kompleksnimi profili DGGE vzorcev sedimenta dokazujejo, da

smo izolirali manj številčne predstavnike sedimentne mikrobne združbe, saj se je le nekaj lis čistih kultur na gelu ujemale z lisami DGGE profilov sedimentnih vzorcev.

Ugotovili smo, daje analiza profilov DGGE primerna metoda za ugotavljanje pestrosti mikrobne združbe rečnega sedimenta, vendar bi z dodatnimi koraki, kot so izrezovanje, kloniranje in identifikacija posameznih prog, lahko prepoznali dominantnejše bakterijske skupine v vzorcih sedimenta. Pridobljene informacije bi koristno prispevale k temeljitejšemu poznavanju biološkega stanja sedimenta, predvsem sedimenta z različnimi onesnažili obremenjenih rek.

#### 5 VIRI

- Atlas R.M., Bartha R. 1998. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4<sup>th</sup> ed. Menlo Park, California; Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: 694 str.
- Bogataj J. 2009. Problematika nizkih pretokov Kamniške Bistrice med Kamnikom in Domžalami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, FGG: 123 str.
- Brečko Grubar V. 2007. Vloga naravnogeografskih značilnosti porečja pri sonaravnem upravljanju z vodnimi viri v porečju Kamniške Bistrice. Dela 28: 305–321, doi:10.4312/dela.28.21.305-321
- Direktiva 2008/105/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 16. decembra 2008 o okoljskih standardih kakovosti na področju vodne politike, spremembi in poznejši razveljavitvi direktiv 82/176/EGS, 83/513/EGS, 84/156/EGS, 84/491/EGS, 86/280/EGS ter spremembi Direktive 2000/60/ES Evropskega parlamenta in Sveta.  
<http://vlex.com/source/uradni-list-evropske-unije-2193/issue/2008/12/24/01> (10. sep. 2010)
- Edwards I.P., Bürgmann H., Miniaci C., Zeyer J. 2006. Variation in Microbial Community Composition and Culturability in the Rhizosphere of *Leucantheropsis alpina* (L.) Heywood and Adjacent Bare Soil along an Alpine Chronosequence. Microbial Ecology, 52: 679–692, doi:10.1007/s00248-006-9097-x
- Findlay S. 2010. Stream microbial ecology. Journal of the North American Benthological Society, 29, 1: 170–181, doi:10.1899/09-023.1
- Globovnik L. 2002. Vodnogospodarska osnova povodja Kamniške Bistrice. Ljubljana, Vodnogospodarski inštitut: 92 str.
- Hodnik A. 1988. Tekstura tal. V: Kemične analize talnih vzorcev, rastlinskih vzorcev in odcednih vod., BF, Katedra za pedologijo, prehrano rastlin in ekologijo: 59–62.  
[http://www.arso.gov.si/vode/podatki/arhiv/Podatki%20reke%202010%20LOQ\\_za%20splet.pdf](http://www.arso.gov.si/vode/podatki/arhiv/Podatki%20reke%202010%20LOQ_za%20splet.pdf) (13. nov. 2014)  
[http://www.arso.gov.si/vode/podatki/arhiv/Sava\\_zgornji\\_del\\_2008.pdf](http://www.arso.gov.si/vode/podatki/arhiv/Sava_zgornji_del_2008.pdf) (10. sep. 2010)
- <http://www.ccn-domzale.si/> (20. sep. 2014)
- Hullar M.A.J., Kplan L.A., Stahl D. 2006. Recurring seasonal dynamics of microbial communities in stream habitats.

- Applied and Environmental Microbiology, 72: 713–722, doi:10.1128/AEM.72.1.713-722.2006
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.). New York, John Wiley & Sons, Inc.: 115–148
- Letno poročilo o kvaliteti pitne vode v letu 2006 iz vodovodov v upravljanju Javnega komunalnega podjetja Prodnik d.o.o. Domžale. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj. 20 str. [http://www.prodnik.si/images/editor\\_pic/Microsoft%20Word%20-%20ZZV%20Prodnik07b.pdf](http://www.prodnik.si/images/editor_pic/Microsoft%20Word%20-%20ZZV%20Prodnik07b.pdf) (13. sep. 2010)
- Letno poročilo o kvaliteti pitne vode v letu 2007 iz vodovodov v upravljanju Javnega komunalnega podjetja Prodnik d.o.o. Domžale. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj. 22 str. [http://www.prodnik.si/images/editor\\_pic/Microsoft%20Word%20-%20Prodnik07b.pdf](http://www.prodnik.si/images/editor_pic/Microsoft%20Word%20-%20Prodnik07b.pdf) (13. sep. 2010)
- Litchfield C.D., Floodgate G.D. 1975. Biochemistry and microbiology of some Irish Sea sediments: II. Bacteriological analyses. Marine Biology, 30: 97–103, doi:10.1007/BF00391584
- Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology, 66, 8: 3616–3620, doi:10.1128/AEM.66.8.3616-3620.2000
- Monitoring kakovosti površinskih vodotokov v Sloveniji v letu 2006. 2008. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, ARSO: 127 str.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 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, 3: 695–700
- Nealson K.H. 1997. Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? Annual Review of Earth and Planetary Sciences, 25: 403–434, doi:10.1146/annurev.earth.25.1.403
- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Weishuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus, H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by TGGE. Journal of Bacteriology, 178: 5636–5643
- Ocena ekološkega in kemijskega stanja rek v Sloveniji v letih 2007 in 2008. 2010. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, ARSO: 116 str.
- Ocena stanja rek v Sloveniji v letih 2009 in 2010. 2012. Agencija Republike Slovenije za okolje: 35 str. [www.arso.gov.si/vode/reke/.../REKE%20porocilo%202009-2010.pdf](http://www.arso.gov.si/vode/reke/.../REKE%20porocilo%202009-2010.pdf) (10. nov. 2014)
- Odllok o območjih vodonosnikov in njihovih hidrografskih zaledij, ogroženih zaradi fitofarmaceutvskih sredstev. 2002. Ur. l. RS, št. 97/02: 10627
- Pantarella F, Berlutti F, Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. 2007. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. Journal of Applied Microbiology, 102: 992–999
- Polz M.F., Cavanaugh C.M. 1998. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. Applied and Environmental Microbiology, 64, 10: 3724–30
- Poročilo o delu CČN Domžale-Kamnik d.o.o. za leto 2007. Domžale: 80 str. [http://www.ccn-domzale.si/images/stories/o-podjetju/porocila/porocilo\\_o\\_delu\\_2007.pdf](http://www.ccn-domzale.si/images/stories/o-podjetju/porocila/porocilo_o_delu_2007.pdf) (15. sep. 2010)
- Poročilo o delu CČN Domžale-Kamnik d.o.o. za leto 2008. Domžale: 82 str. [http://www.ccn-domzale.si/images/stories/o-podjetju/porocila/porocilo\\_o\\_delu\\_2008.pdf](http://www.ccn-domzale.si/images/stories/o-podjetju/porocila/porocilo_o_delu_2008.pdf) (15. sep. 2014)
- Poročilo o delu CČN Domžale-Kamnik d.o.o. za leto 2009. Domžale: 76 str. <http://www.ccn-domzale.si/images/stories/porocilo2009.pdf> (15. sep. 2010)
- Poročilo o kakovosti pitne vode iz vodooskrbnih sistemov v upravljanju Javnega komunalnega podjetja Prodnik d.o.o. za leto 2008. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj: 26 str. [http://www.prodnik.si/images/editor\\_pic/LetPro\\_08.pdf](http://www.prodnik.si/images/editor_pic/LetPro_08.pdf) (13. sep. 2010)
- Poročilo o kakovosti pitne vode iz vodooskrbnih sistemov v upravljanju Javnega komunalnega podjetja Prodnik d.o.o. za leto 2009. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj: 23 str. [http://www.prodnik.si/images/editor\\_pic/LProd09.pdf](http://www.prodnik.si/images/editor_pic/LProd09.pdf) (13. sep. 2010)
- Poročilo o pitni vodi iz vodooskrbnih sistemov v upravljanju Javnega komunalnega podjetja Prodnik d.o.o. za leto 2010. Zavod za zdravstveno varstvo Kranj: 22 str. [http://www.prodnik.si/e\\_files/content/zzvk2010.pdf](http://www.prodnik.si/e_files/content/zzvk2010.pdf) (15. okt. 2014)
- Speksnijder A.G.C.L., Kowalchuk G.A., De Jong S., Kline E., Stephen J.R., Laanbroek H.J. 2001. Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely Related 16S rRNA Gene Sequences. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1: 469–472, doi:10.1128/AEM.67.1.469-472.2001
- Spring S., Schulze R., Overmann J., Schleifer K.-H. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. FEMS Microbiology Reviews, 24: 573–590, doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00559.x
- Staley J.T., Konopka A. 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Review of Microbiology, 39: 321–46, doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541
- Strokovne podlage za razglasitev ogroženosti podzemne vode v Republiki Sloveniji. 2002. Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Agencija Republike Slovenije za okolje: 98 str.
- Thiyagarajan V., Lau S., Tsoi M., Zhang W., Qian P.Y. 2010. Monitoring bacterial biodiversity in surface sediment using terminal restriction fragment length polymorphism analysis (T-RFLP): application to coastal environment. Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea, 151–163
- Uredba o stanju površinskih voda. Ur.l. RS, št. 14/09, št.98/10 [http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r00/predpis\\_URED5010.html](http://zakonodaja.gov.si/rpsi/r00/predpis_URED5010.html) (10. sep. 2014)
- von Wintzigerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 21: 213–229, doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173, 2: 697–703