

UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

# **MAGISTRSKO DELO**

Leon MARIČ

Maribor, 2020

UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Leon MARIČ

**Taksonomska opredelitev ocetnokislinskih bakterij  
*Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436  
in *Komagataeibacter* sp. AV429**

MAGISTRSKO DELO

Mentorica: red. prof. dr. Janja TRČEK

Maribor, 2020

**Marič, L.: Taksonomska opredelitev oacetnokislinskih bakterij *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *Komagataeibacter* sp. AV429. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2020.**

## IZVLEČEK

Iz industrijskih bioreaktorjev za proizvodnjo jabolčnega kisa smo v okviru projekta PKP osamili nove seve oacetnokislinskih bakterij. Analiza njihovih medgenskih regij 16S-23S rDNA je odkrila tri seve (*Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *Komagataeibacter* sp. AV429), ki potencialno predstavljajo nove bakterijske vrste. V tem delu smo z različnimi fenotipskimi in genotipskimi pristopi pregledali njihove lastnosti z namenom, da ugotovimo njihov taksonomski položaj med ostalimi referenčnimi sevi oacetnokislinskih bakterij. V fenotipsko analizo smo uvrstili tudi vse referenčne seve iz rodu *Komagataeibacter*. Fenotipska preiskava je obsegala opazovanje morfologije kolonij, barvanje po Gramu, katalazni in oksidazni test, sposobnost sinteze celuloze in oksidacije očetne kisline, identifikacijo posameznih vrst glukonskih kislin, analizo celokupnih maščobnih kislin, rast na različnih virih ogljika, rast v prisotnosti 30 % glukoze, sposobnost uporabe N iz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ob prisotnosti različnih virov ogljika, rast brez etanola in očetne kisline, rast ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola in različnih koncentraciji očetne kisline ter rast v anaerobnih in aerobnih razmerah. Za sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo preverili tudi rast brez očetne kisline, rast na acetatu pri pH 2,5, rast v prisotnosti etanola in laktata, rast na gojišču AE brez glukoze ter sposobnost uporabe različnih virov ogljika. Vsem sevom smo pregledali nukleotidna zaporedja genov za 16S rRNA in medgenske regije 16S-23S rDNA ter celotna genomska zaporedja. Ugotovili smo, da je genomsko zaporedje seva *Komagataeibacter* sp. AV382 najbolj podobno vrsti *Komagataeibacter kaciacei* (ANIb 88,73 %) in seva *Komagataeibacter* sp. AV436 vrsti *Komagataeibacter xylinus* (ANIb 91,55 %). Na podlagi fenotipskih lastnosti lahko sev *Komagataeibacter* sp. AV382 razlikujemo od ostalih vrst rodu *Komagataeibacter* po tem, da producira 2-keto in 5-ketoglukonsko kislino, dobro raste na ribozi in propanolu, ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze in ne sintetizira celuloze. Sposoben je uporabiti N iz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  v prisotnosti manitola na gojišču Hoyer-Frateur in Asai. V tekočem gojišču ne oblikuje biofilma, ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola pa tolerira do 5 % očetne kisline. Sev *Komagataeibacter* sp. AV436 lahko na podlagi fenotipskih lastnosti od ostalih vrst rodu *Komagataeibacter* razlikujemo po tem, da sintetizira celulozo, tvori 2-keto in 5-ketoglukonsko kislino, dobro raste na ribozi in propanolu, vendar ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze. Ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola tolerira do 5 % očetno kislino. Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 je po analizi genomske sekvence pokazal največjo podobnost z vrsto *Gluconacetobacter entanii* (ANIb 98,02 %), a njegove fenotipske lastnosti se od referenčnega seva znatno razlikujejo. Glede na zgornje rezultate predlagamo uvrstitev sevov *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV436 v novi vrsti znotraj rodu *Komagataeibacter*.

**Ključne besede:** oacetnokislinske bakterije, kis, rod *Komagataeibacter*, taksonomija

**Marič, L.: Taxonomic Characterization of Acetic Acid Bacteria *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 and *Komagataeibacter* sp. AV429. Master of Science Thesis, University of Maribor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Department of Biology, 2020.**

## ABSTRACT

This study deals with novel strains of acetic acid bacteria isolated from industrial bioreactors for production of apple cider vinegar. The analysis based on 16S-23S rDNA resulted in identification of three strains (*Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 and *Komagataeibacter* sp. AV429) that could represent novel bacterial species. To determine their taxonomic position in comparison to other reference strains of acetic acid bacteria, we examined here their phenotypic and genotypic properties. The reference strains of *Komagataeibacter* genus have also been included in this study. The phenotypic analysis included colony morphology, Gram staining, catalase and oxidase activity, cellulose synthesis, acetic acid oxidation, detection and identification of gluconic acids, analysis of fatty acid methyl esters (FAME), growth on different carbon sources, growth in the presence of 30 % D-glucose, utilization of nitrogen from  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , growth in the absence of ethanol and acetic acid, growth in the presence of 1 % or 3 % ethanol and different concentrations of acetic acid, and growth under anaerobic or aerobic conditions. For the strain *Komagataeibacter* sp. AV429 additional properties have been tested, such as growth in the absence of acetic acid on AE medium, growth on acetate at pH 2,5, growth in the presence of ethanol and lactate, growth on AE medium without glucose, and utilization of different carbon sources. For all three strains sequences of 16S rRNA gene, the internal transcribed spacer of 16S-23S rDNA, and whole genomic sequence have been analyzed. Results showed that the closest related species of *Komagataeibacter* sp. AV382 and *Komagataeibacter* sp. AV436 are *K. kakiaceti* (ANIb 88.73 %) and *K. xylinus* (ANIb 91.55 %), respectively. The strain *Komagataeibacter* sp. AV382 can be differentiated from other reference species of *Komagataeibacter* genus by its ability to form 2-keto and 5-keto-D-gluconic acid and incapability to grow in the presence of 30 % glucose. Furthermore, strain does not form pellet in liquid medium, and tolerates up to 5 % of acetic acid in the presence of 1 % or 3 % ethanol. It grows on Asai or Hoyer-Frateur medium supplemented with D-glucose or D-mannitol and can utilize ribose and propanol as carbon sources. The strain *Komagataeibacter* sp. AV436 can be differentiated from other *Komagataeibacter* species by its ability to form 2-keto and 5-keto-D-gluconic acid, synthesize cellulose, and growth on ribose and propanol. Furthermore, in the presence of 1 % or 3 % ethanol, the strain tolerates acetic acid up to 5 %, but growth is absent in the presence of 30 % glucose. For the strain *Komagataeibacter* sp. AV429 genome sequence analysis showed a high similarity with strain *Komagataeibacter entanii* (ANIb 98.02 %), although their phenotypic properties differ substantially. Based on the data collected in this study, we propose for strains *Komagataeibacter* sp. AV382 and *Komagataeibacter* sp. AV436 classification into novel species of *Komagataeibacter* genus.

**Key words:** acetic acid bacteria, vinegar, *Komagataeibacter* genus, taxonomy

# KAZALO VSEBINE

<b>IZVLEČEK.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 OSNOVNE LASTNOSTI OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	3
2.2 ZNAČILNOSTI METABOLIZMA OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	3
2.3 UPORABA OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	6
2.4 UČINEK OCETNE KISLINE NA CELICE.....	9
2.5 TAKSONOMSKA UVRSTITEV OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	10
2.5.1 Rod <i>Komagataeibacter</i> .....	12
2.6 IDENTIFIKACIJA VRST OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	13
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIALI.....	16
3.1.1 SEVI OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ.....	16
3.1.2 RASTNA GOJIŠČA .....	17
3.1.3 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	20
3.2 METODE .....	21
3.2.1 IZOLACIJA IN NAMNOŽEVANJE OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ .....	21
3.2.2 FENOTIPSKU METODE.....	21
3.2.2.1 Morfologija kolonij .....	21
3.2.2.2 Barvanje po Gramu.....	22
3.2.2.3 Katalazni test .....	22
3.2.2.4 Oksidazni test .....	22
3.2.2.5 Sposobnost sinteze celuloze.....	22
3.2.2.6 Sposobnost oksidacije očetne kisline .....	23
3.2.2.7 Identifikacija posameznih vrst glukonskih kislin.....	23

3.2.2.8 Rast na različnih virih ogljika .....	24
3.2.2.9 Rast v prisotnosti 30 % D-glukoze .....	24
3.2.2.10 Sposobnost uporabe dušika iz (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na gojišču Hoyer-Frateur in Asai.....	24
3.2.2.11 Rast na gojišču RAE brez etanola in oetne kisline .....	25
3.2.2.12 Rast v tekočem gojišču z različno vsebnostjo etanola in oetne kisline .....	25
3.2.2.13 Analiza celokupnih maščobnih kislin.....	25
3.2.2.14 Rast v anaerobnih in aerobnih razmerah .....	26
3.2.2.15 Rast seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 brez oetne kisline.....	26
3.2.2.16 Rast seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 na acetatu pri vrednosti pH 2,5.....	26
3.2.2.17 Rast seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 v prisotnosti etanola ali laktata .....	27
3.2.2.18 Rast seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 na gojišču AE brez glukoze .....	27
3.2.2.19 Sposobnost rasti v prisotnosti propanola .....	27
3.2.2.20 Izkoriščanje različnih virov ogljika v gojišču AE .....	27
3.2.2.21 Rast v gojišču AE s 3 % etanola in brez oetne kisline.....	28
3.2.2.22 Rast v gojišču AE z laktatom ali glukonatom .....	28
3.2.3 GENOTIPSKE METODE .....	28
3.2.3.1 Izolacija DNA.....	28
3.2.3.2 Gelska elektroforeza.....	28
3.2.3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	29
3.2.3.4 Čiščenje pomnoženih genov ter priprava vzorcev za sekvenciranje .....	29
3.2.3.5 Analiza nukleotidnih zaporedij .....	30
3.2.3.6 Konstrukcija filogenetskih dreves.....	30
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>31</b>
4.1 FENOTIPSE LASTNOSTI .....	31
4.1.1 SPOSOBNOST RASTI SEVOV NA KOMPLEKSNIH GOJIŠČIH .....	31
4.1.2 OSNOVNE FENOTIPSE LASTNOSTI PREISKOVANIH SEVOV OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ....	32
4.1.3 DODATNE FENOTIPSE LASTNOSTI SEVA <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429.....	36
4.1.4 RAST SEVOV V PRISOTNOSTI OCETNE KISLINE .....	38
4.1.5 VRSTE MAŠČOBNIH KISLIN V CELOKUPNI BAKTERIJSKI BIOMASI .....	40
4.1.6 VRSTE KETO-GLUKONSKIH KISLIN V GOJIŠČU ZA NAMNOŽEVANJE BAKTERIJ .....	42
4.2 GENOTIPSE LASTNOSTI .....	43
4.2.1 NAMNOŽENI SPECIFIČNI DNA-ODSEKI .....	43
4.2.2 POLOŽAJ NOVIH SEVOV V FILOGENETSKIH DREVESIH .....	44
4.2.3 PRIMERJAVA CELOTNIH GENOMSKIH ZAPOREDIJ NA OSNOVI VREDNOSTI ANI.....	51
4.2.4 PRIMERJAVA GENOMOV Z <i>in-silico</i> HIBRIDIZACIJO DNA-DNA.....	57

4.2.5 ANALIZA VSEBNOSTI PROFAGOV V PREISKOVANIH SEVIH .....	58
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>62</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>67</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>68</b>
<b>8 ZAHVALA.....</b>	<b>70</b>
<b>9 VIRI .....</b>	<b>71</b>
<b>10 PRILOGE .....</b>	<b>81</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Oksidacija etanola v očetno kislino v povezavi z dihalno verigo .....	4
<b>Slika 2:</b> Oksidacija glukoze v periplazmi oacetnokislinskih bakterij .....	5
<b>Slika 3:</b> Dihalna veriga oacetnokislinskih bakterij .....	6
<b>Slika 4:</b> Oksidacija etanola v očetno kislino na gojišču Carr .....	32
<b>Slika 5:</b> Oksidacija očetne kisline vrste <i>Komagataeibacter</i> sp. AV382 .....	32
<b>Slika 6:</b> Biofilm seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV436 .....	33
<b>Slika 7:</b> Rast seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 na acetatu pri vrednosti pH 2,5. ....	37
<b>Slika 8:</b> Rast preiskovanih sevov v tekočem gojišču RAE (1/1) .....	38
<b>Slika 9:</b> Rast preiskovanih sevov v gojišču RAE s 3 % etanolom in 5 % očetno kislino .....	39
<b>Slika 10:</b> Rast seva <i>K. intermedius</i> v tekočem gojišču RAE (3/6) .....	40
<b>Slika 11:</b> Ločitev glukonskih kislin s tankoplastno kromatografijo .....	42
<b>Slika 12:</b> Gelska elektroforeza po pomnožitvi medgenske regije .....	43
<b>Slika 13:</b> Gelska elektroforeza po pomnožitvi gena za 16S rRNA .....	43
<b>Slika 14:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov za 16S rRNA z metodo največjega verjetja .....	45
<b>Slika 15:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov 16S rRNA z metodo združevanja sosedov .....	46
<b>Slika 16:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov 16S rRNA z metodo največje varčnosti .....	47
<b>Slika 17:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA z metodo največjega verjetja .....	48
<b>Slika 18:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA z metodo združevanja sosedov .....	49
<b>Slika 19:</b> Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA z metodo največje varčnosti .....	50
<b>Slika 20:</b> Slikovni prikaz ujemanja genomskih zaporedij preiskovanih in referenčnih vrst rodu <i>Komagataeibacter</i> .....	55



<b>Slika 21:</b> Slikovni prikaz deleža podobnosti (%) preiskovanih in referenčnih vrst rodu <i>Komagataeibacter</i> .....	56
<b>Slika 22:</b> Pozicija profagov v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV382.....	59
<b>Slika 23:</b> Proteinske strukture regije 1 v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV382 .....	59
<b>Slika 24:</b> Pozicija profagov v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429.....	60
<b>Slika 25:</b> Proteinske virusne strukture regije 1 v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 .....	60
<b>Slika 26:</b> Proteinske virusne strukture regije 2 v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 .....	60
<b>Slika 27:</b> Proteinske virusne strukture regije 3 v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 .....	61
<b>Slika 28:</b> Pozicija profaga v genomu seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV436.....	61
<b>Slika 29:</b> Proteinske strukture regije profaga v sevu <i>Komagataeibacter</i> sp. AV436.....	61

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Uporaba bakterijskih zunajceličnih polisaharidov v živilstvu in medicini .....	8
<b>Preglednica 2:</b> Rast preiskovanih in referenčnih sevov očetnokislinskih bakterij na treh kompleksnih gojiščih .....	31
<b>Preglednica 3:</b> Osnovne fenotipske lastnosti preiskovanih sevov .....	32
<b>Preglednica 4:</b> Fenotipske lastnosti preiskovanih vrst v primerjavi z referenčnimi sevi rodu <i>Komagataeibacter</i> .....	35
<b>Preglednica 5:</b> Fenotipske lastnosti preiskovanega seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 .....	36
<b>Preglednica 6:</b> Sposobnost uporabe različnih virov ogljika seva <i>Komagataeibacter</i> sp. AV429 .....	37
<b>Preglednica 7:</b> Rasti na gojišču RAE z 1% in 3% etanolom in različno koncentracijo očetne kisline preiskovanih vrst v primerjavi z referenčnimi sevi .....	39
<b>Preglednica 8:</b> Vsebnost celokupnih maščobnih kislin preiskovanih sevov ter referenčnega seva <i>K. cocois</i> na gojišču RAE (1/1) .....	41
<b>Preglednica 9:</b> Vsebnost celokupnih maščobnih kislin preiskovanih sevov in referenčnega seva <i>K. cocois</i> na gojišču GY .....	41
<b>Preglednica 10:</b> Vrednosti ANIb preiskovanih sevov v primerjavi z ostalimi predstavniki rodu <i>Komagataeibacter</i> .....	52
<b>Preglednica 11:</b> Vrednosti ANIm preiskovanih sevov v primerjavi z ostalimi predstavniki rodu <i>Komagataeibacter</i> .....	53
<b>Preglednica 12:</b> Rezultati in silico hibridizacije DNA-DNA (DDH) .....	57
<b>Preglednica 13:</b> Barvna legenda genov, ki kodirajo sestavne dela virusa .....	58

## UPORABLJENI SIMBOLI IN KRATICE

ADH	Alkohol dehidrogenaza
AE	Gojišče za izolacijo in namnoževanje oacetnokislinskih bakterij iz kisa
ALDH	Aldehid dehidrogenaza
ANI	Delež ujemanja genomskega zaporedja (angl.: Average nucleotide identity)
COX	Citokrom c oksidaza
EPS	Zunajcelični polisaharidi
MA	Gojišče z manitolom
PQQ	Pirolokinolin kinon
PQQ-GADH	Pirolokinolin kinon dehidrogenaza glukonata
PQQ-GDH	Pirolokinolin kinon dehidrogenaza glukoze
PQQ-GLDH	Pirolokinolin kinon dehidrogenaza glicerola
RAE	Obogateno gojišče za izolacijo in namnoževanje oacetnokislinskih bakterij iz kisa
UOX	Ubikinol oksidaza
UQ	Ubikinon
UQH <sub>2</sub>	Ubikinol

# 1 UVOD

Oacetnokislinske bakterije so razširjeni mikroorganizmi v naravnem in umetnem okolju. Za svojo rast nujno potrebujejo kisik in primeren vir ogljika, ki ga lahko oksidirajo v alkohole, aldehide ali različne oblike sladkorjev. Zato so oacetnokislinske bakterije razširjene na sadju in rožah, v industrijskem okolju pa v proizvodnji kisa, kefirja, kombuče in v tovarnah, ki fermentirajo kakovova zrna. Oacetnokislinske bakterije pa so v nekaterih pijačah, npr. sadnih sokovih in vinu, kvarljivci (Moonmangmee in sod., 2002; Bartowsky in Henschke 2008; Škraban in Trček, 2017).

Med 19 poznanimi rodovi je še posebej za vrste iz rodu *Gluconobacter* značilna rast v okolju bogatem s sladkorji, medtem ko je za seve iz rodu *Acetobacter* in *Komagataibacter* bolj značilna rast v prisotnosti etanola in drugih alkoholov. Nekateri predstavniki rodov *Gluconacetobacter*, *Swaminathania* in *Acetobacter* živijo v mutualističnem odnosu z rastlinami kot fiksatorji zračnega dušika (Fuentes-Ramirez in sod., 2001, Loganathan in Nair, 2004; Dutta in Gachhui, 2006; Pedraza in sod., 2008).

Oacetnokislinske bakterije niso patogeni mikroorganizmi za ljudi in živali, z izjemo vrste *Granulibacter bethesdensis*, ki povzroča limfadenitis (vnetje bezgavk), vročino in izgubo teže pri bolnikih s kronično granulomatozno boleznijo. Polega te vrste je bilo v zadnjih letih opisanih nekaj oportunističnih vrst, npr. *Acetobacter cibinongensis* in *Asaia bogorensis*, ki so bile izolirane iz obolelih za kroničnimi boleznimi (npr. cistična fibroza), našli pa so jih tudi pri ljudeh s stalno vnesenimi medicinskimi pripomočki (npr. kateter ali cevke pri peritonealni dializi) (Greenberg in sod., 2006; Gouby in sod., 2007; Alauzet in sod., 2010; Snyder in sod., 2004; Tuuminen in sod., 2006).

Ta skupina bakterij je ime dobile po svoji najbolj značilni lastnosti, tj. sposobnosti oksidacije etanola v očetno kislino, čeprav med 19 opisanimi rodovi najdemo tudi takšne, ki niso odporni proti očetni kislini, npr. rod *Asaia*. Ta lastnost oacetnokislinskih bakterij omogoča pridobivanje različnih vrst kisa. Zaradi različnih vrst substratov in tehnologij pridobivanja kisa, bioreaktorji za industrijsko pridobivanje kisa predstavljajo vir novih vrst oacetnokislinskih bakterij, s fenotipskimi lastnostmi, ki jih lahko uporabimo v drugih industrijskih procesih (npr. pridobivanje zunajceličnih polisaharidov kot sta nanoceluloza in acetani).

## 1.1 NAMEN RAZISKOVALNEGA DELA IN RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Namen dela:

- Sevom oacetnokislinskih bakterij *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *Komagataeibacter* sp. AV429 preiskati genomsko zaporedje in z različnimi bioinformatičnimi orodji izračunati njihovo podobnost z genomi že poznanih vrst iz rodu *Komagataeibacter*.
- Preiskati fenotipske lastnosti sevov *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *Komagataeibacter* sp. AV429 v primerjavi z referenčnimi vrstami iz rodu *Komagataeibacter*.

Raziskovalni hipotezi:

- Seva *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV436 predstavljata novi vrsti oacetnokislinskih bakterij.
- Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 lahko opišemo kot neotipsko vrsto *Gluconacetobacter entanii*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OSNOVNE LASTNOSTI OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

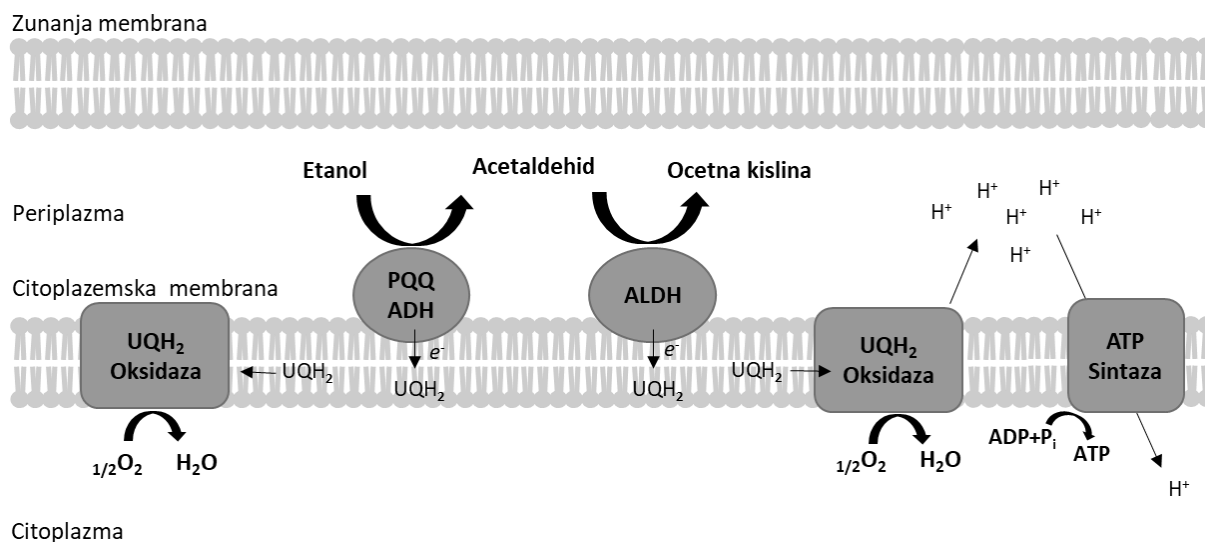
Ocetnokislinske bakterije se barvajo po Gramu negativno in ne tvorijo spor. Imajo paličasto do elipsoidno obliko in rastejo izključno v aerobnih razmerah, zaradi česar spadajo v skupino obligatno aerobnih organizmov. Rastejo posamično, v paru ali oblikujejo krajše verižice, v neugodnih razmerah pa lahko oblikujejo nitaste strukture. So relativno majhne bakterije, z velikostjo od 0,4 do 1  $\mu\text{m}$  v premeru ter dolžino od 0,8 do 4,5  $\mu\text{m}$  (Cleenwerck in De Vos, 2008). Rastejo lahko pri nizkih vrednostih pH, do 3, čeprav je optimalno območje za rast med pH 5 in 6,5. Za nekatere vrste oacetnokislinskih bakterij je značilna zelo visoka odpornost proti očetni kislini, npr. za vrsto *Komagataeibacter europaeus* proti 10 % ali celo več. Optimalna temperatura za rast oacetnokislinskih bakterij je med 25 °C in 30 °C, nekateri sevi pa lahko rastejo tudi pri povišani temperaturi, npr. 37 °C (Kerstens in sod., 2006).

### 2.2 ZNAČILNOSTI METABOLIZMA OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Aerobni mikroorganizmi z oksidacijo različnih virov ogljika do  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  učinkovito pridobivajo energijo za svojo rast in razmnoževanje. Ta proces lahko ustavijo inhibitorne snovi, npr. stranski produkti biokemijskih reakcij ali neugodne razmere za rast. Nekateri organizmi pa tudi pri aerobnih razmerah vodijo nepopolno oksidacijo sladkorjev, kar vodi do nastanka različnih vrst kislin, aldehydov ali specifičnih stereoizomer sladkorjev. Ta lastnost je pri oacetnokislinskih bakterijah povezana s prisotnostjo številnih dehidrogenaz, ki so pritrjene na zunanjo stran citoplazemske membrane. Zaradi te lastnosti so oacetnokislinske bakterije uporabne v prehrambeni in biotehnološki industriji (Raspor in Goranovič 2008; De Vero in sod., 2010; Adachi in sod., 2003; Deppenmeier in Ehrenreich, 2009).

Primer nepopolne oksidacije pri oacetnokislinskih bakterijah je oksidacija etanola v očetno kislino. Ta lastnost je še posebej značilna za vrste iz rodov *Acetobacter* in *Komagataeibacter*, saj so te vrste tekom evolucije razvile tudi mehanizme za toleranco proti visokim koncentracijam očetne kisline. Oksidacijo etanola katalizirata dva encima, ki se nahajata na zunanji strani citoplazemske membrane: alkohol dehidrogenaza (ADH) v prisotnosti koencima

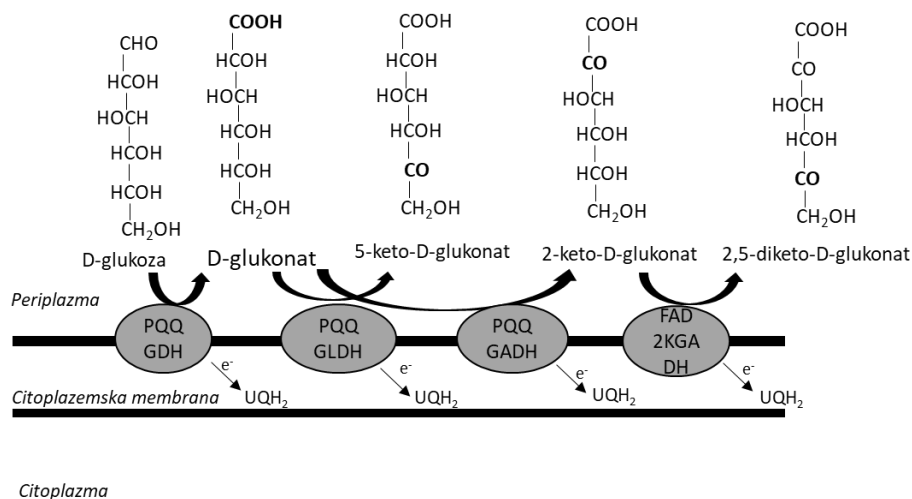
pirolokinolin kinona (PQQ) oksidira etanol v acetaldehid, tega pa aldehid dehidrogenaze (ALDH) v očetno kislino (slika 1). Elektroni, ki se pri tem sproščajo, se prenesejo neposredno na ubikinol oksidazo (UOX), preko nje pa se vključijo v dihalno verigo. Acetaldehid in očetna kislina se kopičita v gojitvenem mediju, rezultat tega pa je zniževanje vrednosti pH med oksidacijo. Izražanje gena, ki kodira encim PQQ-ADH, je konstitutivno, kar pomeni, da se izraža ves čas, tudi ob odsotnosti etanola. Encim je sestavljen iz treh podenot: katalitične podenote z dehidrogenazno aktivnostjo, ki ima vezan konecim PQQ in hem c ter podenote citokrom c, ki sodelujejo pri redukciji ubikinonov ter tretjo najmanjšo podenoto, ki pa je odsotna pri vrstah iz rodu *Komagataeibacter* (Saichana in sod., 2015; Matsushita in sod., 2008; Trček in sod., 2006). Encim ALDH ni tako dobro raziskan kot ADH, sta pa oba encima aktivna tudi pri nizkih vrednosti pH. Za encim ALDH pa je bilo ugotovljeno, da je aktiven tudi pri visoki temperaturi. Encim ALDH pri 60 °C po 30 min ohrani 50 % svoje prvotne aktivnosti, zaradi česar je proizvodnja kisa pri visoki temperaturi omejena s stabilnostjo encima ADH (Saichana in sod., 2015; Kanchanarach in sod., 2010).



Slika 1: Prikaz encimov za oksidacijo etanola v očetno kislino v povezavi z dihalno verigo (Povzeto po Prust in sod., 2005; Saichana in sod., 2015).

V citoplazemski membrani očetnokislinskih bakterij pa je tudi PQQ-odvisna glukoza dehidrogenaza (PQQ-GDH), ki oksidira D-glukozo v  $\delta$ -glukono-lakton, ta pa se spontano ali pa s pomočjo glukonolaktonaze pretvori v D-glukonat (slika 2). Encim PQQ-GDH je sestavljena iz 2 podenot: večja podenota vsebuje PQQ in je odgovorna za oksidacijo D-glukoze, medtem ko

funkcija manjše podenote še ni znana. Nastali D-glukonat je pomemben v industriji, predvsem kot aditiv v prehrani, skupaj s kalcijevim kompleksom pa se uporablja tudi kot kovinski lak v proizvodnji leč (Saichana in sod., 2015). D-glukonat se lahko s pomočjo glicerol dehidrogenaze (PQQ-GLDH) pretvori v 5-keto-D-glukonat ali pa s pomočjo glukonat dehidrogenaze (PQQ-GADH) v 2-keto-D-glukonat. Nekatere vrste pa 2-keto-D-glukonat lahko pretvorijo v 2,5-diketo-D-glukonat (Matsushita in sod., 1994; Singh in Kumar, 2007; Toyama in sod., 2007, Shinagawa in sod., 2009). Koliko glukonata bo bakterija producirala je odvisno od razmer namnoževanja seva (Ano in sod., 2011; Saichana in sod., 2015). Nastala 2-keto in 5-keto-glukonata pa se lahko transportirata v citoplazmo, kjer se uporabita kot vir ogljika (Saichana in sod., 2015).

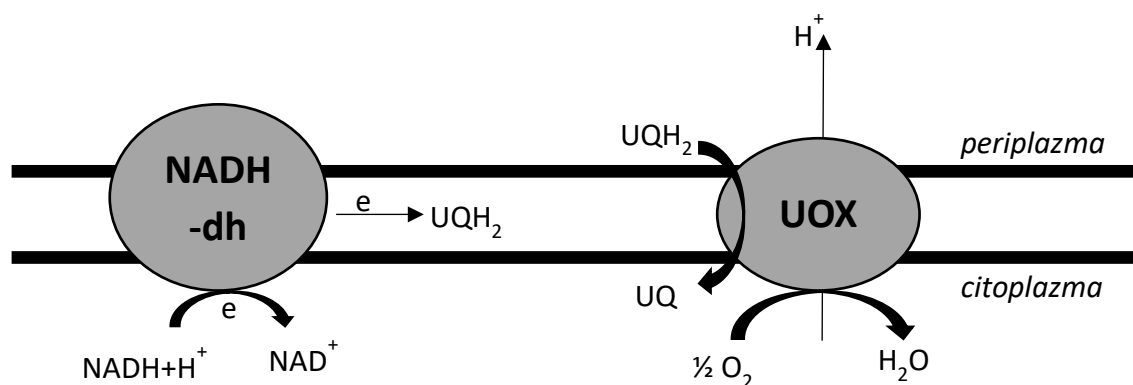


Slika 2: Oksidacija glukoze v periplazmi očetnokislinskih bakterij (Povzeto po Saichana in sod., 2015).

Pri striktno aerobnih bakterijah je končni prejemnik elektronov v dihalni verigi vedno O<sub>2</sub>. Terminalne oksidaze, ki reducirajo O<sub>2</sub>, v aerobnih bakterijah delimo na dve skupini: oksidaze hem-baker in oksidaze tipa *bd*. Za očetnokislinske bakterije je značilna prva skupina z vezano eno enoto hema (hem a, hem o ali hem b), ki reducira kisik ter baker. Med oksidaze hem-baker spada citokrom c oksidaza (COX) in ubikinol oksidaza (UOX). Katero od teh dveh oksidaz imajo očetnokislinske bakterije, je odvisno od tega, ali oksidaza prejme elektron iz citokroma c (COX) ali pa iz ubikinola (UOX) (Matsutani in sod., 2014).



Oacetnokislinske bakterije imajo na membrano vezane različne encimske komplekse. Ubikinon oksidaza NADH-dh oksidira  $\text{NADH}^+$  do  $\text{NAD}^+$  ali  $\text{NADP}^+$ . Pri tem nastanejo elektroni, ki se prenašajo preko prenašalca ubikinola ( $\text{UQH}_2$ ) h končnemu prejemniku elektronov, tj.  $\text{O}_2$ . Oksidacijo ubikinola v ubikinon in redukcijo  $\text{O}_2$  do vode katalizira encim ubikinol oksidaza (UOX) (slika 3). Pri predstavnikih rodu *Acetobacter* je prenašalec elektronov ubikinon UQ-9, medtem ko je pri ostalih UQ-10 (Prust in sod., 2005; Thi in sod., 2013; Saichana in sod., 2015). Pri prenašanju elektronov se ustvari protonski gradient, ki na koncu prispeva h generiranju ATP z encimom ATP-sintazo tipa  $\text{F}_1\text{F}_0$ . Takšna dihalna veriga omogoča hitro oksidacijo mnogih sladkorjev, zaradi česar nastane v okolju bakterij veliko produktov. To lahko predstavlja za oacetnokislinske bakterije prednost v okolju v katerem je prisotnih še mnogo drugih organizmov, s katerimi oacetnokislinske bakterije tekmujejo (Matsutani in sod., 2014).



Slika 3: Dihalna veriga oacetnokislinskih bakterij (Povzeto po Saichana in sod., 2015).

### 2.3 UPORABA OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Oacetnokislinske bakterije so v živilstvu pomembne v proizvodnji fermentiranih izdelkov, npr. kefirja in kombuče, proizvodnji kisa in za pridobivanje nanoceluloze, a hkrati so pri proizvodnji drugih izdelkov, npr. piva in vina, lahko kvarljivci. Uporaba oacetnokislinskih bakterij v fermentaciji živil se je začela z namenom podaljšanja roka trajanja hitro pokvarljivim izdelkom. Danes pa se bakterije in njihovi encimi pogosto uporabljajo z namenom pridobitve živil z novimi lastnostmi (npr. aromo itd.). S procesom acidifikacije in pretvarjanjem aminokislin lahko vplivamo na rok trajanja, teksturo, okus in barvo (Leroy in Vuyst, 2004; Hugenholtz, 2013).

Uporaba oacetnokislinskih bakterij v živilstvu je najbolj znana v produkciji kisa. Njegovo odkritje sega v antične čase, kjer so po naključju opazili, da se je odprto vino spontano spremenilo v kis. Sledilo je odkritje številnih uporabnih vrednosti kisa, še posebej so ga začeli uporabljati za podaljšanje obstojnosti živil, saj lahko s pomočjo kisa ubijemo večino mikroorganizmov. Kis zaradi vsebnosti očetne kisline, ki jo producirajo oacetnokislinske bakterije (komercialni kis vsebuje 4-6 % očetne kisline), deluje bakteriostatično in ustavi razmnoževanje prisotnih bakterij ali pa celo baktericidno in bakterijske celice popolnoma inhibira v rasti in razmnoževanju (Giudici in sod., 2009).

Nepopolna oksidacija etanola v očetno kislino, ki jo vodijo oacetnokislinske bakterije, se uporablja v produkciji hrane in pijač, kot je npr. pivo Lambic, pa tudi v proizvodnji vodnega kefirja, kombuče in kakava. Belgijsko pivo Lambic je osvežilno alkoholno kislno pivo z dodatkom sadja. Nastane s fermentacijo mešanice vode, ječmenovega slada, nemlete pšenice in posušenega hmelja (Spitaels in sod., 2014). Vodni kefir je osvežilna pijača s kislim okusom in nastane s spontano fermentacijo mešanice vode, saharoze, posušenega sadja in dekstranovih zrn (Laureys in De Vuyst, 2014). V čaju kombuča pa oacetnokislinske bakterije fermentirajo mešanico vode, sladkorja in pravega čaja (De Roos in De Vuyst, 2018). Oacetnokislinske bakterije skupaj z mlečnokislinskimi bakterijami in kvasovkami sodelujejo tudi pri fermentaciji kakavovih zrn, kar je prvi korak v procesu pridelave čokolade (De Roos in De Vuyst, 2018).

Bakterije pa s pretvarjanjem enostavnih sladkorjev v sestavljene sintetizirajo in izločajo v okolje različne uporabne zunajcelične polisaharide (EPS), ki se razlikujejo po strukturi, funkciji in za človeka uporabni vrednosti (Marič in sod., 2019). Najbolj poznani zunajcelični homopolisaharidi so celuloza, levan, poligalaktan, kurdlan in skleroglukan, med heteropolisaharidi pa alginska kislina, gelan, hialuronska kislina, ksantan, dekstran in heparin. Te polisaharide zaradi njihovih zanimivih lastnosti lahko uporabljamo v živilski industriji, kozmetiki in medicini ter farmaciji (preglednica 1). Oacetnokislinske bakterije sintetizirajo zunajcelične polisaharide kot je celuloza, levan in acetan. Takšni zunajcelični polisaharidi tvorijo zunajcelični matriks in sodelujejo pri nastanku biofilma (Deppenmeier in Ehrenreich, 2009). Oacetnokislinske bakterije so najbolj znani in najbolj pogosto uporabljeni mikroorganizmi za pridobivanje bakterijske celuloze. V primerjavi z rastlinsko celulozo je bakterijska strukturno čistejša, saj ne vsebuje lignina, hemiceluloze in pektina. Biološka

funkcija bakterijske celuloze se razlikuje od rastlinske. Pri rastlinah je pomembna kot strukturna komponenta celične stene in je nujna za preživetje rastlinskih celic, medtem ko bakterijska celuloza ni nujna za preživetje bakterijske celice, vseeno pa omogoča preživetje bakterij v neugodnih razmerah s tvorbo biofilma (Augimeri in sod., 2015). Med zunajceličnimi polisaharidi, ki jih proizvajajo oacetnokislinske bakterije, se najbolj uporabljata levan in celuloza. Lastnosti celuloze omogočajo široko uporabo v medicini, kjer jo uporabljajo kot material za konstrukcijo umetne kože, kot material za umetne krvne žile, služijo pa tudi kot membrane in obliži za rane (Gorgieva in Trček, 2019). Celuloza se uporablja tudi v sistemih za transport zdravil, v proizvodnji žvečilnih gumijev in filtrov. V živilstvu je uporabna kot stabilizacijsko sredstvo v hrani, v tekstilni industriji pa je primerna kot material za oblačila. Primerna je tudi za proizvodnjo visoko kakovostnega papirja (Augimeri in sod., 2015; Römling in Galperin, 2015).

Levan poveča število koristnih bakterij v prebavnem traktu (*Lactobacillus* in *Bifidobacterium*), kar se kaže v izboljšanjem zdravju človeka. Lahko ga uporabljamo tudi kot sladilo, prehransko vlaknino in fruktozni sirup v komercialnih pijačah. Zaradi povečanja volumna kruha in izboljšanja njegove strukture ga uporabljamo v proizvodnji kislega testa in brezglutenskega kruha. Sicer pa levan lahko učinkuje tudi protimikrobno, vendar mehanizem protimikrobnega delovanja še ni povsem raziskan (Öner in sod., 2016).

Preglednica 1: Uporaba bakterijskih zunajceličnih polisaharidov v živilstvu in medicini.

	Zunajcelični polisaharid	Uporaba
<b>Živilstvo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levan</li> <li>• Alginska kislina</li> <li>• Celuloza</li> <li>• Gelan</li> <li>• Ksantan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sladila</li> <li>• Prehransko vlakno</li> <li>• Fruktozni sirup</li> <li>• Proizvodnja kislega testa in brezglutenskega kruha</li> <li>• Stabilizatorji živil</li> <li>• Zgoščevalci živil</li> <li>• Želirna sredstva v hrani in pijači</li> <li>• Protimikrobna sredstva</li> </ul>
<b>Medicina in farmacija</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dekstran</li> <li>• Ksantan</li> <li>• Alginska kislina</li> <li>• Gelan</li> <li>• Hialuronska kislina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Matrice za oblikovanje tkiv</li> <li>• Nosilci zdravil</li> <li>• Obliži za rane</li> <li>• Prebiotiki</li> <li>• Sistem nadzorovanega sproščanja zdravil</li> <li>• Zniževanje koncentracije holesterola</li> <li>• Dodatki v kremah</li> <li>• Zgoščevalci in stabilizatorji farmacevtskih raztopin</li> </ul>
<b>Kozmetika</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Levan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodatki v šamponih, penah, kremah in lakih za lase</li> </ul>

V zadnjih letih so odkrili, da lahko oacetnokislinske bakterije najdemo tudi v prebavilih žuželk, kot partnerje v simbiotskem odnosu. Razširjenost in raznolikost oacetnokislinskih bakterij v posameznih tkivih različnih vrst žuželk sta zanimivi področji raziskovanja, ker bi se ta znanja lahko uporabila za zatiranje žuželk ali pa tudi za nadzorovanje prenosa tistih bolezni, ki jih prenašajo posamezne žuželke (Crotti s sod., 2010; Trček, 2014). Našli so jih na primer v vinski mušici (*Drosophila melanogaster*), komarju (*Anopheles*, *Aedes*), čebeli (*Apis mellifera*), škržatku (*Scaphoideus titanus*) in volnati uši (*Saccharicoccus sacchari*). Žuželke teh skupin se prehranjujejo s hranili, ki so bogata s sladkorji (nektar, sadni sladkor). Oacetnokislinske bakterije niso nujno potrebne za preživetje teh žuželk, zato niso primarni simbionti, vendar njihova vloga v gostiteljski žuželki še ni povsem znana. Zelo verjetno pa so oacetnokislinske bakterije vključene v zagotavljanje hranil gostitelju, zniževanje vrednosti pH v prebavilih gostitelja, s čimer ustvarjajo razmere za zaščito pred škodljivimi mikroorganizmi, ali/in v vzdrževanje raznolikosti mikrobiote v žuželkah ter tako zagotavljanje ustreznih hranil koristnim mikroorganizmom gostitelja.

Oacetnokislinske bakterije so zmožne tudi fiksacije dušika (Pedraza in sod., 2008) zaradi česar so pomembne tudi v agronomiji. Najdemo jih kot simbionte v sladkornem trstu, kavovcu, rižu, čajevcu, ananasu, mangu, rizosferi bananovca in koruzi (Cavalcante and Döbereiner, 1988; Jiménez-Salgado in sod., 1997; Loganathan in sod., 1999; Muthukumarasamy in sod., 2005; Tapia-Hernández in sod., 2000).

## 2.4 UČINEK OCETNE KISLINE NA CELICE

Ocetna kislina je šibka organska kislina, ki se pogosto dodaja živilskim produktom z namenom, da se izognemo kvarjenju hrane zaradi prisotnosti mikroorganizmov. Nizka koncentracija oetne kisline, tj. 0,1-0,7 %, inhibira rast večine patogenih organizmov v živilih, kot so na primer bakterije vrste *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in enterohemoragična *Escherichia coli* (EHEC) (Levine in Fellers, 1940; Entani in sod., 1998; Ryssele in sod., 2009; Fraise in sod., 2013). Nekatere bakterije kot so *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus* oblikujejo biofilm, ki jim omogoča večjo odpornost na stresne dejavnike kot so antibiotiki in druga protimikrobna sredstva. Zaradi tega je za izkoreninjenje

teh bakterij potrebna višja koncentracija očetne kisline 0,5-1% (Bjarnsholt in sod., 2015). Majhna koncentracija očetne kisline lahko ubije tudi vrsto *Mycobacterium tuberculosis* in druge mikobakterije ter lahko tako nadomesti strupena in draga baktericidna sredstva (Cortesia in sod., 2014).

V primeru, da so se bakterije zmožne prilagoditi na določeno koncentracijo očetne kisline, lahko postanejo bolj odporne na očetno kislino in tudi na druge stresorje. Tako npr. bakterija *Salmonella typhimurium* v primeru adaptacije na očetno kislino lažje tolerira HCl (Kwon in Rickie, 1998). Očetna kislina je šibka organska kislina in pri nizki vrednosti pH ne disociira. Kislina je protonirana in tako z lahkoto prehaja skozi membrane v citosol celice. V citoplazmi pa zaradi povišane vrednosti pH disociira, zaradi česar se v celici kopičijo protoni, zniža pa se vrednost pH. Posledica tega je zmanjšana metabolna aktivnost, kar pa lahko privede do smrti celice (Trček in sod., 2015).

Odpornost očetnokislinskih bakterij proti očetni kislini omogočajo mehanizmi znotraj celice in mehanizmi, ki preprečujejo vstop očetne kisline v celico. Znotraj celice reducirajo koncentracijo očetne kisline z razgradnjo le-te. Sposobne pa so tudi transportirati protone iz celice s pomočjo antiporterjev  $K^+/H^+$  ter črpati acetat v zunanost celice s pomočjo specifičnih črpalk. S pokritjem celične površine s polisaharidi pa očetnokislinske bakterije lahko postavijo prepreko, ki ovira prehod očetne kisline v notranost celice (Trček in sod., 2015).

## 2.5 TAKSONOMSKA UVRSTITEV OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

V preteklosti so očetnokislinske bakterije obravnavali kot majhno taksonomsko skupino, katera je vključevala samo dva rodova *Acetobacter* in *Gluconacetobacter*. V zadnjih nekaj letih pa se je z razvojem novih molekularnih metod in tehnik identificiranja taksonomija očetnokislinskih bakterij zelo spremenila. Trenutno skupina raznolikih očetnokislinskih bakterij vključuje 19 rodov (Trček in Barja, 2015).

Očetnokislinske bakterije uvrščamo v razred *Alphaproteobacteria*. V splošnem imajo očetnokislinske bakterije zmožnost oksidirati etanol do očetne kisline ter glukozo do glukonske kisline zaradi česar jih uvrščamo v družino *Acetobacteraceae* (Gillis in De Ley 1980, Sievers in Swings 2005, Kersters in sod., 2006, Komagata in sod., 2014).

V družino *Acetobacteraceae* uvrščamo rod *Acetobacter*, katerega je leta 1898 prvi opisal Beijerinck z glavnim predstavnikom tega rodu *Acetobacter aceti* (Pasteur, 1864). Leta 1935 je Asai opisal še drugi rod oacetnokislinskih bakterij imenovan *Gluconobacter*. Rod *Acetobacter* je vključeval predstavnike, ki oksidirajo etanol bolj intenzivno kot glukozo in imajo zmožnost oksidacije očetne kisline do ogljikovega dioksida in vode. Rod *Gluconobacter* pa je vključeval bakterije, ki v primerjavi z etanolom bolj intenzivno oksidirajo glukozo in nimajo zmožnosti oksidacije očetne kisline. Leta 1954 je Leifson predlagal uvrstitev nekaterih predstavnikov v rod *Acetomonas*. Ta rod so predstavljale bakterije s polarnim običkanjem (to so bakterije, ki imajo biček pritrjen na eno ali obe strani celice), in ki nimajo zmožnosti oksidacije očetne kisline. Takšne bakterije se na primer razlikujejo od predstavnikov rodu *Acetobacter* po tem, da imajo biček samo na polarnem delu, medtem ko je za bakterije rodu *Acetobacter* značilno, da imajo bičke razporejene po celotni površini. Takšno razporeditev bičkov imenujemo peritrihno običkanje. Poleg tega se predstavniki rodu *Acetomonas* razlikujejo od predstavnikov rodu *Acetobacter* po tem, da ne oksidirajo očetne kisline do etanola in vode.

Yamanda (1969) je ugotovil, da glavna rodova oacetnokislinskih bakterij, *Acetobacter* in *Gluconobacter*, lahko ločimo glede na prisotnost vrste ubikinona: v predstavnikih rodu *Acetobacter* je prisoten ubikinon UQ-9 in v predstavnikih rodu *Gluconobacter* UQ-10.

Leta 1984 sta Yamada in Kondo znotraj rodu *Acetobacter* predlagala podrod *Gluconacetobacter*, vendar takšna klasifikacija ni bila odobrena, sta pa bila kasneje rodova *Gluconacetobacter* in *Acidomonas* kot samostojna rodova oacetnokislinskih bakterij (Yamada in sod., 1997). Rod *Gluconacetobacter* so razdelili na dve podskupini: skupino bakterij, ki so podobne vrsti *Gluconacetobacter liquefaciens* in skupino bakterij, ki so podobne vrsti *Gluconacetobacter xylinus* (Franke in sod., 1999; Yamanda in sod., 2000). Del teh vrst je bil leta 2013 reklasificiran v nov rod *Komagataeibacter* (Yamanda, 2013).

Trenutno je v družini oacetnokislinskih bakterij *Acetobacteraceae* poznanih 19 rodov. To so *Acetobacter* (Beijerinck, 1898), *Gluconobacter* (Asai, 1935), *Acidomonas* (Yamashita in sod., 2004), *Gluconacetobacter* (Yamanda in sod., 1998), *Asaia* (Yamanda in sod., 2000), *Kozakia* (Lisdianti in sod., 2002), *Swaminathania* (Loganathan in Nair, 2004), *Saccharibacter* (Jojima in sod., 2004), *Neoasia* (Yukphan in sod., 2006), *Granulibacter* (Greenberg in sod., 2006), *Tanticharoenia* (Yukphan in sod., 2008), *Ameyamaea* (Yukphan in sod., 2010),

*Neokomagataea* (Yukphan in sod., 2011), *Komagataeibacter* (Yamanda in sod., 2013), *Endobacter* (Ramirez-Bahena in sod., 2013), *Nguyenibacter* (Vu in sod., 2013), *Swingsia* (Malimas in sod., 2014), *Bombella* (Li in sod., 2015) in *Commensalibacter* (Roh in sod., 2008).

### 2.5.1 Rod *Komagataeibacter*

Rod teh bakterij je poimenovan po japonskem profesorju Kazou Komagata, ki se je ukvarjal s sistematiko bakterij, predvsem oacetnokislinskih. Bakterije tega rodu nimajo bičkov in ne producirajo 2,5-diketoglukonata iz glukoze ter ne tvorijo rjavega, v vodi topnega pigmenta na virih glukoze, peptona, kvasnega ekstrakta in kalcijevega karbonata. Celice so po Gramu negativne, velike od 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  do 1-3  $\mu\text{m}$  ter rastejo posamično, v parih ali oblikujejo verigo. Oblikujejo okrogle, svetleče, bele ali kremaste kolonije, ki imajo hrapavo ali gladko površino, ki je lahko konveksna ali izbočena. Imajo pozitivno katalazno aktivnost in negativno oksidazno aktivnost (nimajo citokrom *c* oksidaze). Ocetno kislino producirajo iz etanola, acetat in laktat pa oksidirajo do  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ . Nekatere vrste tega rodu za rast nujno potrebujejo očetno kislino, večina jih raste pri vrednosti pH 3,0. Najpogostejša maščobna kislina, ki jo producirajo oacetnokislinske bakterije tega rodu je  $\text{C}_{18:1\omega 7\text{c}}$ . Vsebnost gvanina in citozina je med 58 in 64 mol %.

V rod *Komagataeibacter* filogenetsko uvrščamo 17 vrst oacetnokislinskih bakterij. To so *Komagataeibacter xylinus* (Brown, 1886), *Komagataeibacter hansenii* (Gossele in sod., 1983), *Komagataeibacter europaeus* (Sievers in sod., 1992), *Komagataeibacter oboediens* (Sokollek in sod., 1998), *Komagataeibacter intermedius* (Boesch in sod. 1998), *Gluconacetobacter entanii* (Schüler, Hertel in Hammes, 2000), *Komagataeibacter swingsii* (Dellaglio in sod., 2005)), *Komagataeibacter rhaeticus* (Dellaglio in sod., 2005), *Komagataeibacter saccharivorans* (Lisdianti in sod., 2006), *Komagataeibacter nataicola* (Lisdianti in sod., 2006), *Komagataeibacter kombuchae* (Dutta in Gachhui 2007), *Komagataeibacter sucrofermentans* (Toyosaki in sod., 1996), *Komagataeibacter kakiaceti* (Iino in sod., 2012), *Komagataeibacter medellinensis* (Castro in sod., 2013), *Komagataeibacter maltaceti* (Slapšak in sod., 2013), *Komagataeibacter cocois* (Liu, 2018) in *Komagataeibacter pomaceti* (Škraban in sod., 2018).

## 2.6 IDENTIFIKACIJA VRST OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Identifikacija bakterij temelji na uporabi polifaznega taksonomskega pristopa, ki združuje opis fenotipskih, genotipskih in kemotaksonomskih lastnosti sevov (Cleenwerck in De Vos, 2008).

Prvotno je identifikacija oacetnokislinskih bakterij temeljila na uporabi fenotipskih pristopov, predvsem različnih biokemijskih testov, v zadnjih 20 letih pa so ključne postale metode, ki preiskujejo različna DNA-zaporedja (Cleenwerck in De Vos, 2008). Tako so npr. za preiskovanje populacijske dinamike oacetnokislinskih bakterij iz različnih vrst vzorcev uporabili metode kot je polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP), denaturirajoča gradientska gelska elektroforeza (DGGE), metoda PCR v realnem času, MALDI-TOF MS, metoda PCR na podlagi ponavljajoče sekvence (REP-PCR), metoda PCR z začetnim oligonukleotidom (GTG)<sub>5</sub>, ((GTG)<sub>5</sub>-rep-PCR) ali pa neposredno sekvenciranje gena 16S rRNA ter medgenske regije (ITS) 16S-23S rDNA (De Vuyst in sod., 2008; Papalexandratou in sod., 2009; Ruiz in sod., 2000; Gonzales in sod., 2005). Z razvojem molekularnih metod in nižjimi stroški sekvenciranja za identifikacijo bakterij je hitro naraslo tudi število novo opisanih vrst oacetnokislinskih bakterij. Analiza PCR-RFLP je postala zastarela, saj se je za boljšo možnost izkazalo sekvenciranje specifičnih genomskih regij. Zelo sorodne vrste med seboj včasih ne moremo razlikovati na podlagi primerjave genov za 16S rRNA, zato so začeli uporabljati druge genomске markerje kot so sekvenca gena, ki kodira protein RecA, sekvence gena prve podenote dehidrogenaze AdhA, šaperonov DnaJ in GroEL in  $\beta$ -podenote polimeraze RNA (Trček, 2005; Cleenwerck in sod., 2010) ter elongacijski faktor Tu (Yetiman in Kesmen, 2015). Kot najbolj uporabno za razlikovanje različnih vrst oacetnokislinskih bakterij se je pokazalo medgensko zaporedje 16S-23S rDNA (Trček in Barja, 2015).

Zlati standard filogenetskih analiz je sekvenciranje gena 16S rRNA, na podlagi katerega lahko identificiramo nove takson. Ta sekvenca se je skozi evolucijo pri prokariotskih mikroorganizmih zelo dobro ohranila zaradi njene enake funkcije v različnih organizmih. Sekvenca gena za 16S rRNA je velika 1450 baznih parov, kar je dovolj za bioinformatično obdelavo, poleg tega pa je sekvenc, s katerimi lahko primerjamo preiskovano sekvenco, v podatkovni bazi zelo veliko (Janda in Abbott, 2007). V primeru, da se naša sekvenca ujema s sekvenco v podatkovni bazi v več kot 98,7 %, lahko potrdimo, da gre za isto vrsto. Če je



ujemanje manjše kot 98,7 %, lahko sev smatramo kot potencialno novo vrsto (Thompson in sod., 2013). Na podlagi te sekvence pa ne moremo primerjati vrst, ki so si med seboj zelo sorodne. V tem primeru lahko uporabimo alternativno možnost, tj. sekvenciranja medgenske regije 16S-23S rDNA. Greenberg in sodelavci (2006) so na podlagi medgenske regije identificirali novo vrsto *Granulibacter bethesdensis*, prvo oportunistično patogeno oacetnokislinsko bakterijo, ki so jo izolirali iz pacienta s kronično granulomatozno boleznijo. Primer tesno sorodnih vrst sta vrsti *Acetobacter cerevisiae* in *Acetobacter malorum*, katerih sekvenca gena 16S rRNA izkazuje 99,9 % podobnost in se razlikuje samo v 2 nukleotidih. Zaradi tega je za identifikacijo omenjenih vrst primerna samo medgenska regija 16S-23S rDNA. Dolžina medgenske regije je različna med rodovi in vrstami, obsega od 759 do 778 baznih parov in vsebuje gene, ki kodirajo tRNA<sup>Ile</sup> in tRNA<sup>Ala</sup> ter antiterminalno sekvenco (Trček in Barja, 2015).

Nekatere molekularne metode zahtevajo veliko predhodnega dela in priprave vzorcev, zato niso primerne za rutinsko identifikacijo velikega števila vzorcev (Trček in Barja, 2015). S tem namenom so Karas in sodelavci (1985) razvili metodo MALDI-TOF MS s katero lahko razlikujemo tudi oacetnokislinske bakterije znotraj rodu, vrste in sevov (Andres-Barrao in sod., 2012; Andres-Barrao in sod., 2013; Wieme in sod., 2014). Analiza temelji na primerjavi masnih spektrov biomolekul, v tem primeru proteinov oacetnokislinskih bakterij, katerih profil je specifičen za seve ene vrste. Profil masnega spektra nato primerjamo z obstoječimi podatkovnimi bazami (Theel in sod., 2012). Takšna analiza je v primerjavi s sekvenciranjem medgenske regije cenovno ugodnejša, poleg tega lahko analiziramo več vzorcev naenkrat. Vseeno pa so začetni stroški zaradi nakupa dragega aparata večji, zaradi tega je potrebno dobro premisliti katero metodo je bolj pametno uporabiti (Trček in Barja, 2015).

Razvoj sekvenciranja celotnega genoma je omogočil natančnejšo analizo in klasifikacijo bakterij. S pomočjo programskih orodij lahko tudi konstruiramo filogenetska drevesa na podlagi primerjave več genov ali specifičnega gena med preiskovanimi vrstami. Lahko pa primerjamo tudi podobnost v aminokislinskem zaporedju med celotnimi genomi. V tem primeru primerjamo vse gene, ki kodirajo proteine. Analiza ujemanja genomskega zaporedja (ANI, angl.: Average Nucleotide Identity) omogoča primerjavo celotnega nukleotidnega zaporedja dveh genomov, rezultat pa oceni evolucijsko oddaljenost med preiskovanimi

organizmi. V primeru ujemanja genomov v manj kot 94 % lahko ugotovimo, da preiskovani sev predstavlja novo vrsto. Takšen rezultat lahko primerjamo tudi z analizo DDH (angl.: DNA-DNA hybridization), kjer je kot mejna vrednost za detekcijo nove vrste uporabljena vrednost 70 %. Sekvence lahko primerjamo tudi na podlagi uporabe kodonov (angl.: codon usage bias), podobnosti metabolnih poti, analize osrednjega genoma (angl.: core genome) in pangenoma. Osrednji genom predstavljajo vsi geni, ki so nepogrešljivi za delovanje nekega klada, medtem ko pangenom predstavlja gene osrednjega genoma in gene, ki so specifični za določene seve (Thompson in sod., 2013).

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 SEVI OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Novi izolati oacetnokislinskih bakterij iz jabolčnega kisa, proizvedenega v submerznem industrijskem procesu:

- *Komagataeibacter* sp. AV382
- *Komagataeibacter* sp. AV429
- *Komagataeibacter* sp. AV436

Referenčni sevi oacetnokislinskih bakterij:

- *Komagataeibacter swingsii* (LMG 22125<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter xylinus* (LMG1515<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter medellinensis* (LMG1693<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter sucrofermentans* (LMG 18788<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter europaeus* (LMG 18890<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter nataicola* (LMG 01536<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter saccharivorans* (LMG1582<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter kakiaceti* (LMG26206<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter oboediens* (LMG 18849<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter intermedius* (LMG 18909<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter cocois* (JCM 31140<sup>T</sup>)
- *Komagataeibacter pomaceti* (LMG 30150<sup>T</sup>)

### 3.1.2 RASTNA GOJIŠČA

Trdo gojišče RAE:

- 4 % glukoze,
- 1 % kvasnega ekstrakta,
- 1 % peptona,
- 0,137 % citronske kisline,
- 0,388 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 1 % agarja,
- 1 % etanola (96%),
- 1 % očetne kisline (100%).

Trdo gojišče GY:

- 5 % glukoze,
- 0,5 % kvasnega ekstrakta,
- 1,5 % agarja.

Trdo gojišče GY s 30 % glukoze:

- 30 % glukoze,
- 0,5 % kvasnega ekstrakta,
- 1,5 % agarja.

Trdo gojišče z manitolom (MA):

- 25 g/l manitola,
- 5 g/l kvasnega ekstrakta,
- 3 g/l peptona,
- 15/l g agarja.

Trdo gojišče Frateur:

- 1,5 % CaCO<sub>3</sub>,
- 1 % kvasnega ekstrakta,
- 2 % etanola (96 %),
- 1,5 % agarja.

Trdo gojišče Carr:

- 3 % kvasnega ekstrakta,
- 2 % etanola (96 %),
- 0,002 % bromkrezol zelenega,
- 1,5 % agarja.

Tekoče gojišče za detekcijo in identifikacijo ketoglukonskih kislin:

- 2 % glukoze,
- 2 % Na-glukonata,
- 0,3 % peptona,
- 0,3 % kvasnega ekstrakta.

Tekoče gojišče RAE:

- 4 % glukoze,
- 1 % kvasnega ekstrakta,
- 1 % peptona,
- 0,137 % citronske kisline,
- 0,388 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O,
- 1 % etanola (96 %),
- 1 % očetne kisline (100 %).

Tekoče gojišče RAE brez očetne kisline in etanola:

- 4 % glukoze,
- 1 % kvasnega ekstrakta,
- 1 % peptona,
- 0,137 % citronske kisline,
- 0,388 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ .

Tekoče gojišče AE (4/3):

- 0,2 % kvasnega ekstrakta,
- 0,3 % peptona,
- 0,5 % glukoze,
- 4 % očetne kisline,
- 3 % etanola.

Tekoče gojišče Asai:

- 0,3 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,
- 0,3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 0,2 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 5 % vir ogljika (glukoza, D-manitol, 96 % etanol),
- pH = 6,8.

Tekoče gojišče Hoyer-Frateur:

- 0,1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,
- 0,09 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
- 0,01 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,
- 0,025 %  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0,002 %  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,
- 3 % vir ogljika (glukoza, D-manitol, 96 % etanol),
- pH = 6,8.

Tekoče gojišče za analizo rasti na različnih virih ogljika (D-riboza, sorbitol, D-manitol, D-glukonat, glicerol, 1-propanol):

- 0,5 % kvasnega ekstrakta,
- 1 % vir ogljika,
- pH = 6,8.

### 3.1.3 KEMIČALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

Za izolacijo DNA smo uporabili komercialni komplet proizvajalca Thermo Scientific, GeneJET Genomic DNA Purification, proteinazo K (20mg/ml), RNazo (10mg/ml) in 50 % etanol.

Za pripravo reakcijske mešanice za pomnoževanje DNA z metodo PCR smo uporabili: 2 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), začetne oligonukleotide (za medgensko regijo 16S-23S rRNA SpaRev (5'-GTGCC(A/T)AGGCATCCACCG-3') in SpaFw (5'-TGCGG(T/C)TGGATCACCTCCT-3') ter za gen 16S rRNA rH1542 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') in fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')), 10-kratni *Taq*-pufer s KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> in *Taq*-polimerazo (5 U/μl, Thermo Scientific). Pomnožene DNA-produkte smo očistili s komercialnim kompletom GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific).

Za pripravo agaroznega gela za gelsko elektroforezo smo uporabili agarozo (Sigma-Aldrich), 50-kratni pufer TAE (242 g/l Tris, 57,1 ml/l očetne kisline, 100 ml/l 0,5M EDTA, pH 8), 10-kratni pufer za nanos DNA (475 μl glicerola, 475 μl 2-kratni pufer TE, 2mM EDTA, pH 8, 50 μl 20% bromfenol modrega), raztopino etidijevega bromida (1 μg/ml), DNA-velikostni standard 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) ter vodo.

Za ločevanje glukonskih kislin s tankoplastno kromatografijo smo uporabili etilacetat, očetno kislino, metanol, difenilamin, anilin, aceton in fosforjevo kislino.

Za izolacijo celokupnih maščobnih kislin smo uporabili natrijev hidroksid, klorovodikovo kislino in tetra-butil metil eter.

Za barvanje po Gramu smo uporabili komercialni komplet proizvajalca Sigma-Aldrich.

Za ugotavljanje katalazne aktivnosti smo uporabili 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, za ugotavljanje oksidazne aktivnosti 1 % raztopino fenilendiamin dihidroklorida (TMPD).

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali čaše, stojala, steklenice, merilne valje, vijale, žličke, steklene palčke, magnetna mešala, avtoklavirni trak, avtoklavirne vrečke, petrijevke, cepilne zanke, špatule, epruvete, avtomatske in steklene pipete, nastavke za pipete, birete, kromatografske plošče, razpršilec, plastične pladnje, puhalke, škarje, zaščitne rokavice, erlenmajerice, parafilm, filtrirne diske in brizgalke. Uporabili smo tudi naslednje pripomočke in aparature: tehničnica, kromatografska komora, avtoklav, inkubator, inkubator, stresalnik, mešalnik, digestorij, gorilnik, hladilnik, zamrzovalnik -80 °C, plinski kromatograf, vrtilno mizico, centrifugo, vodno kopel, pH-meter, kadičko in električni napajalnik za gelsko elektroforezo, trans iluminator, računalnik, kalkulator, štoparico in aparaturo za PCR.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 IZOLACIJA IN NAMNOŽEVANJE OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Bakterijske izolate smo pridobili iz industrijskih bioreaktorjev za proizvodnjo jabolčnega kisa v podjetju Apis Vita v okviru projekta Po kreativni poti, ki je potekal leta 2018 na FNM UM. Referenčne seve smo pridobili iz zbirke FNM UM in iz zbirke BCCM v Belgiji. Seve smo hranili pri -80 °C in jih ob uporabi revitalizirali na trdem gojišču RAE z inkubacijo pri 30 °C in vlažni atmosferi 3 dni. Kolonije smo nato precepljali na različna gojišča za fenotipsko karakterizacijo sevov.

### 3.2.2 FENOTIPSKE METODE

#### 3.2.2.1 Morfologija kolonij

Preiskovane seve smo revitalizirali iz -80 °C na gojišču RAE, kolonije 3-krat precepili na enakem gojišču in po pregledovanju z lupo in ravnilom določili velikost, obliko in barvo kolonij.



### 3.2.2.2 Barvanje po Gramu

Bakterije smo namnožili na gojišču RAE in biomaso razmazali v kapljici fiziološke raztopine na objektnem stekelcu. Preparat smo posušili na zraku pri sobni temperaturi in ga fiksirali s trikratnim potegom skozi ogenj. Dodali smo barvilo kristal vijolično in po eni minuti barvilo sprali z vodo. Sledil je dodatek lugola, katerega smo po 1 minuti sprali z vodo. Preparat smo nato še 20 sekund spirali s 50 % etanolom in 50 % acetonom. Preparat smo ponovno spirali z vodo in dodali safranin, ki razbarvane celice obarva rdeče. Safranin smo pustili delovati 1 minuto in ga nato sprali z vodo. Preparat smo posušili na zraku pri sobni temperaturi in ga pogledali pod 1000-kratno povečavo z imerzijskim objektivom (Gerhardt in sod., 1994). Celicam smo določili obliko, velikost, razporeditev in obarvanost po Gramu.

### 3.2.2.3 Katalazni test

Katalazno aktivnost sevov smo preiskali z nanosom biomase na objektno stekelce ter dodatkom 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pojav mehurčkov smo ocenili kot pozitivno aktivnost katalaze (Gerhardt in sod., 1994).

### 3.2.2.4 Oksidazni test

Z oksidazno aktivnostjo ocenimo aktivnosti encima citokroma c oksidaze. Test smo izvedli tako, da smo filter papir navlažili s sveže pripravljeno 1 % raztopino fenilendiamin dihidroklorida (TMPD) in nanj s cepilno zanko nanesli biomaso sevov. V primeru, da smo opazili modrovijolično barvo, smo to ocenili kot pozitivno aktivnost citokroma c oksidaze (Kovacs, 1956).

### 3.2.2.5 Sposobnost sinteze celuloze

Preiskovane seve smo namnožili na gojišču RAE. Pridobljeno biomaso smo kuhali 2 uri v 5 % NaOH ter opazovali konsistenco peleta. Pelet iz celuloze ne razpade (Navarro in sod., 1999).

### 3.2.2.6 Sposobnost oksidacije očetne kisline

Preiskovane seve smo precepili iz gojišča RAE na gojišče Carr in Frateur. Plošče smo inkubirali en teden pri 30 °C. V primeru rasti bakterij na gojišču Frateur smo opazovali nastanek prozornih con ter ponovno transformacijo nazaj v motne cone. Nastanek prozornih con dokazuje oksidacijo etanola do očetne kisline, nastanek ponovno motnih con pa oksidacijo očetne kisline do CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O. V primeru rasti bakterij na gojišču Carr smo spremljali spremembo barve iz zelene v rumeno, kar dokazuje oksidacijo etanola v očetno kislino ter spremembo barve iz rumene nazaj v zeleno, kar dokazuje oksidacijo očetne kisline v CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O. V analizo sposobnosti oksidacije očetne kisline smo kot kontrolo vključili referenčni sev *K. oboediens*.

### 3.2.2.7 Identifikacija posameznih vrst glukonskih kislin

Z namenom detekcije 2-keto-D-glukonske kisline in 5-keto-D-glukonske kisline smo bakterije revitalizirali na gojišču GY in jih inkubirali 4-5 dni pri 30 °C. Zrasle kolonije smo nacepili v tekoče gojišče z 2 % glukoze in 2 % Na-glukonatom in biomaso inkubirali do 11 dni na stresalniku pri 180 vrt/min in 30 °C. Odpipetirali smo 2 ml vzorca namnoženih bakterij v mikrocentrifugirke ter centrifugirali 5 min pri 11000 vrt/min, s čimer smo ločili celice od supernatanta. Poleg vzorcev preiskovanih bakterij smo kot standarda nanesti 2 % glukozo in 2 % Na-glukonat. Kot standard smo uporabili tudi bakterijsko vrsto *Komagataeibacter hansenii* za detekcijo 2-keto in 5-keto-D-glukonske kisline in *Komagataeibacter pomaceti* za detekcijo 2-keto-D-glukonske kisline. Na kromatografsko ploščo Silica gel 60 smo na liniji 1 cm od roba plošče nanesti 3 µl posameznega vzorca in standardov v razmiku 1 cm. Za mobilno fazo smo uporabili etilacetat, očetno kislino, metanol in vodo v razmerju 6 : 1,5 : 1,5 : 1. Kromatografsko ploščo smo namočili v mobilno fazo v kromatografski komori in pustili, da se je mobilna faza pomaknila do vrha. Ploščo smo nato posušili na sobni temperaturi 1 uro in jo orosili z raztopino difenilamina (2 g difenilamina, 2 ml anilina, 100 ml acetona in 15 ml fosforjeve kisline). Kromatografsko ploščo z vzorci smo ponovno posušili na sobni temperaturi in nato še v pečici pri 120 °C 20 minut. 2-keto-glukonske kisline so se po reakciji obarvale roza, medtem ko so se 5-keto-glukonske kisline obarvale sivo (modifikacija metode po Gossele in sod., 1980).

### 3.2.2.8 Rast na različnih virih ogljika

Preiskovane seve smo revitalizirali na trdem gojišču RAE, razen vrste *K. xylinus*, katero smo revitalizirali na gojišču GY. Seve smo precepili v tekoče gojišče RAE, ki je vsebovalo 1 % etanola in 1 % očetne kisline in jih inkubirali en teden na stresalniku (180 vrt/min) pri 30 °C. Namnoženo biomaso smo uporabili kot inokulum za nacepitev tekočega gojišča, ki smo ga uporabili za testiranje uporabe različnih virov ogljika. Gojišče je vsebovalo 0,5 % kvasnega ekstrakta, 1 % vira ogljika in 1 % inokuluma. Vrednost pH smo uravnali na 6,8 z dodajanjem 1 M HCl. Kot vir ogljika smo uporabili: D-ribozo, sorbitol, manitol, glicerol in 1-propanol. Epruvete smo inkubirali na stresalniku pri 180 vrt/min in 30 °C. Rast smo ocenili po 5 dneh in po 15 dneh za ribozo in sorbitol, po 6 dneh za manitol in glicerol ter po 8 dneh za propanol (Škraban in sod., 2018).

### 3.2.2.9 Rast v prisotnosti 30 % D-glukoze

Sposobnost rasti oacetnokislinskih bakterij smo preverili na gojišču GY z dodatkom 30 % glukoze. Plošče smo inkubirali 10 dni pri 30 °C in nato ocenili rast posameznega seva (Škraban in sod., 2018).

### 3.2.2.10 Sposobnost uporabe dušika iz (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na gojišču Hoyer-Frateur in Asai

Revitalizirane bakterije smo iz trdega gojišča RAE precepili v tekoče gojišče RAE z 1 % etanolom in 1 % očetno kislino in jih inkubirali en teden v epruветah na stresalniku (180 vrt/min) pri 30 °C. Nato smo 1 % inokuluma dodali gojišču Hoyer-Frateur in Asai. Kot vir ogljika smo uporabili D-glukozo, D-manitol ali etanol. Epruvete smo inkubirali pri 30 °C na stresalniku (180 vrt/min) ter rast ocenili po 4 in 7 dneh (Škraban in sod., 2018).

### 3.2.2.11 Rast na gojišču RAE brez etanola in očetne kisline

Rast brez prisotnosti očetne kisline in etanola smo preverjali na trdem gojišču RAE brez dodanega etanola in očetne kisline. Plošče smo inkubirali pri 30 °C do enega tedna (Škraban in sod., 2018).

### 3.2.2.12 Rast v tekočem gojišču z različno vsebnostjo etanola in očetne kisline

Bakterije smo namnožili v tekočem gojišču RAE z 1 % etanolom in 1 % očetno kislino in jih inokulirali (1 %) v gojišče RAE z različnimi koncentracijami etanola in očetne kisline. V gojišče smo dodali 1 % etanola in 2,5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % ali 7 % očetne kisline, ter 3 % etanola in 2,5 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % ali 7 % očetne kisline. Epruvete smo inkubirali na stresalniku pri 30 °C in 180 vrt/min ter rast ocenili po 4 in 8 dneh (Škraban in sod., 2018).

Za sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo testirali rast tudi v gojišču AE s 3 % etanola in 4 %, 5 %, 6 %, 7 % ali 8 % očetne kisline. Bakterije smo namnožili na trdem gojišču RAE, od tukaj pa smo kolonijo najprej precepili v tekoče gojišče AE s 3 % etanola in 4 % očetne kisline. Po uspešni rasti smo bakterije inokulirali (1 %) v gojišče AE s 3 % etanola in različnimi koncentracijami očetne kisline. Bakterije smo stresali 11 dni v epruveti (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller in sod., 2000).

### 3.2.2.13 Analiza celokupnih maščobnih kislin

Ker na Oddelku za biologijo UM nimamo plinskega kromatografa za analizo celokupnih maščobnih kislin, smo te analize izvedli v sodelovanju z Biotehniško fakulteto UL. Preiskovane seve bakterijskih vrst *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 smo namnožili na gojišču RAE in GY. V sterilne epruvete smo shranili približno 40 mg biomase posameznega seva iz posameznega gojišča. V vsako epruveto smo dodali reagent 1 (45 g natrijevega hidroksida, 150 ml destilirane vode), vzorce vorteksirali od 5 do 10 minut in jih nato segrevali v vroči kopeli pri 100 °C 5 minut. Vzorce smo nato še enkrat vorteksirali od 5 do 10 minut in jih ponovno inkubirali v vroči kopeli (100 °C) 30 minut. Nato smo izvedli metilacijo z dodatkom reagenta 2 (325 ml klorovodikove kisline, 275 ml

metilnega alkohola). S tem smo dosegli znižanje vrednosti pH pod 1,5 in omogočili metilacijo maščobnih kislin. Vzorce smo nato vorteksirali od 5 do 10 minut ter jih hitro dali v vodno kopel pri 80 °C za 10 minut. Sledil je tretji korak in sicer ekstrakcija, katero smo izvedli z dodatkom 1,25 ml reagenta 3 (200 ml heksana in 200 ml metil tetra-butil etra) ter vzorec nato mešali na mešalniku 10 minut. Po mešanju se je v vzorcu raztopina ločila na zgornjo organsko plast iz maščobnih kislin in spodnjo plast, katero smo odpipetirali in zavrgli. Zgornjo plast iz maščobnih kislin smo nato umili s 3 ml reagenta 4 (10,8 g natrijevega hidroksida, raztopljenega v 900 ml destilirane vode). Vzorce smo nato mešali 10 minut in dve tretjini prenesli v vijale za plinsko kromatografijo (Sasser, 1990).

#### 3.2.2.14 Rast v anaerobnih in aerobnih razmerah

Sposobnost rasti v aerobnih in anaerobnih razmerah smo ocenili po enem tednu namnoževanja bakterij na gojišču RAE pri 30 °C v aerobni in anaerobni atmosferi. Anaerobne razmere smo ustvarili v anaerobnem loncu z generatorjem anaerobne atmosfere (anaerobna vrečka BioMerieux).

#### 3.2.2.15 Rast seva *Komagataeibacter* sp. AV429 brez očetne kisline

Bakterijski sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo iz trdega gojišča RAE inokulirali v tekoče gojišče AE s 3 % etanola in brez očetne kisline, ter rast ocenili po enem tednu stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller in sod., 2000).

#### 3.2.2.16 Rast seva *Komagataeibacter* sp. AV429 na acetatu pri vrednosti pH 2,5

Za oceno sposobnosti rasti preiskovanega seva na acetatu pri vrednosti pH 2,5 smo najprej določili količino očetne kisline, ki jo je potrebno dodati gojišču AE za dosego vrednosti pH 2,5. Pri tem smo si pomagali z univerzalnim indikatorjem za pH. Začetna vrednost pH gojišča je bila 6,5. Ugotovili smo, da ob prisotnosti 1 % očetne kisline vrednost pH gojišča pade na 2,5. V gojišče AE smo tako dodali 1 % očetne kisline, inokulirali bakterijski sev iz trdega gojišča RAE

ter rast ocenili po enem tednu stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller in sod., 2000).

#### 3.2.2.17 Rast seva *Komagataeibacter* sp. AV429 v prisotnosti etanola ali laktata

Rast v prisotnosti etanola ali laktata smo preverjali v gojišču AE s 4 % očetne kisline in 3 % etanola ali 3 % laktata. Sev smo inokulirali iz gojišča RAE ter rast ocenili po enem tednu stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

#### 3.2.2.18 Rast seva *Komagataeibacter* sp. AV429 na gojišču AE brez glukoze

V gojišče AE s 4 % očetne kisline in 3 % etanola, a brez glukoze, smo nacepili sev iz gojišča RAE ter rast ocenili po enem tednu stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

#### 3.2.2.19 Sposobnost rasti v prisotnosti propanola

Za sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo ugotavljali sposobnost rasti v prisotnosti 1-propanola v gojišču AE. Sev smo namnožili v gojišču AE brez očetne kisline in etanola ter namnoženo biomaso uporabili kot inokulum (1 %) v gojišču AE s 4 % očetne kisline, 3 % etanola in 3 % 1-propanola. Rast smo ocenili po enem tednu stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

#### 3.2.2.20 Izkoriščanje različnih virov ogljika v gojišču AE

Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo najprej namnožili v tekočem gojišču AE brez etanola in očetne kisline in z različnimi viri ogljika (glukoza, fruktoza, maltoza, saharoza, glicerol, sorbitol, manitol, glukonat in laktat). Nato smo precepili 1 % bakterijske kulture v gojišče AE z enakim virom ogljika, a z dodanimi 3 % etanola in 4 % očetne kisline. Rast smo ocenili po 13 in 30 dneh stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

### 3.2.2.21 Rast v gojišču AE s 3 % etanola in brez očetne kisline

Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo namnožili v gojišču AE brez očetne kisline in etanola ter uporabili kot inokulum (1 %) za tekoče gojišče AE s 3 % etanola, a brez očetne kisline. Rast smo ocenili po 14 dneh stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

### 3.2.2.22 Rast v gojišču AE z laktatom ali glukonatom

Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo namnožili v gojišču AE brez očetne kisline in etanola ter uporabili kot inokulum (1 %) za tekoče gojišče AE s 3 % etanola in 4 % laktata ali 4 % glukonata. Rast smo ocenili po 14 dneh stresanja epruvete (180 vrt/min) pri 30 °C (Schüller s sod., 2000).

## 3.2.3 GENOTIPSKE METODE

### 3.2.3.1 Izolacija DNA

Biomaso bakterijskih sevov, ki smo jo pridobivali na gojišču RAE, smo postrgali in suspendirali v 1 ml fiziološke raztopine v 1,5 ml mikrocentrifugirkah. Biomaso smo od supernatanta ločili s centrifugiranjem pri 7000 vrt/min 5 min. Supernatant smo zavrgli, biomaso pa do izolacije DNA hranili pri –20 °C. Iz biomase smo DNA izolirali s komercialnim kompletom GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) po navodilih proizvajalca za izolacijo DNA po Gramu negativnih bakterij.

### 3.2.3.2 Gelska elektroforeza

Uspešnost izolacije DNA smo preverili z gelsko elektroforezo tako, da smo v žepke gela nanesti vzorce DNA in DNA-nanašalni pufer ter vzorec ločevali v električnem polju. Z enakim postopkom smo preverili tudi velikost in koncentracijo PCR-pomnožkov. Gelsko elektroforezo smo izvedli tudi po čiščenju DNA. V tem primeru smo na agarozni gel poleg vzorca nanesti še znano koncentracijo DNA-velikostnega standarda ter s primerjavo intenzitete signalov med očiščenim DNA-produktom in DNA-velikostnim standardom ocenili koncentracijo DNA-fragmenta. Ločevanje je potekalo v 1 % agaroznem gelu in pufru TAE pri 120 V 30 minut. Gel

smo nato 15 min barvali v raztopini EtBr, ki se veže med vijačnici DNA. Nespecifično vezan EtBr smo iz gela sprali z namakanjem gela v vodi 10 min. Gel smo nato presvetlili nad UV-svetlobo in sliko analizirali s programom BiodocAnalyze (BDA Biometra).

### 3.2.3.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z metodo PCR smo pomnožili gen za 16S rRNA in medgenske regijo 16-23S rDNA. V 100  $\mu$ l reakcijske mešanice smo uporabili 10  $\mu$ l dNTP (2mM), 1  $\mu$ l smernega začetnega oligonukleotida SpaFW (100pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l protismernega začetnega oligonukleotida SpaRew (100pmol/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l 10-kratnega *Taq*-pufra s KCl, 65,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5  $\mu$ l *Taq*-polimeraze (5 U/ $\mu$ l) in 2  $\mu$ l DNA. Vzorce smo odpipetirali v mikrocentrifugirke za PCR in jih vstavili v aparat PCR (TProfessional Basic, Biometra GmbH).

Za pomnoževanje gena 16S rRNA in medgenske regije 16S-23S rDNA smo uporabili naslednji program:

1. Začetna denaturacija: 3 min pri 95 °C
2. 30-kratna ponovitev naslednjega cikla:
  - Denaturacija: 30 s pri 95 °C
  - Prileganje začetnih oligonukleotidov: 30 s pri 58 °C
  - Polimerizacija: 90 s pri 72 °C (za pomnoževanje gena 16S rRNA) ter 60 s pri 72 °C (za pomnoževanje medgenske regije 16S-23S rDNA)
3. Zaključno podaljševanje: 10 min pri 72 °C

### 3.2.3.4 Čiščenje pomnoženih genov ter priprava vzorcev za sekvenciranje

DNA-odseke, ki smo jih pomnožili z metodo PCR, smo očistili, kar pomeni, da smo odstranili neuporabljene začetne oligonukleotide, dNTP-je in pufer. Vzorec smo očistili po navodilih proizvajalca komercialnega kompleta GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) in



ocenili njihovo koncentracijo kot opisano pod točko 3.2.3.2. Vzorce smo pripravili za sekvenciranje po navodilih podjetja Microsynth AG.

### 3.2.3.5 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja genov za 16S rRNA in medgenskih regij 16S-23S rDNA smo s programom BLAST primerjali z že obstoječimi zaporedji v mednarodni podatkovni bazi GenBank/EMBL/DDJB. Iz genomskih zaporedij smo izračunali vrednosti ANI ter delež G+C s programom JspeciesWS (Richter in Rosselló-Móra, 2009), DNA-DNA hibridizacijo (DDH) s spletnim kalkulatorjem GGDC (Richter in Rosselló-Móra, 2009) in vsebnost profagov s programom PHASTER.

### 3.2.3.6 Konstrukcija filogenetskih dreves

Sekvence smo poravnali s programom ClustalX. Filogenetska drevesa smo konstruirali s programom MEGA7 na podlagi metode največjega verjetja, združevanja sosedov in največje varčnosti.

## 4 REZULTATI

### 4.1 FENOTIPSE LASTNOSTI

#### 4.1.1 SPOSOBNOST RASTI SEVOV NA KOMPLEKSNIH GOJIŠČIH

V raziskavi smo ugotavljali sposobnost rasti novih in referenčnih sevov na treh kompleksnih gojiščih: RAE, GY in MA (preglednica 2).

Preglednica 2: Rast novih in referenčnih sevov oacetnokislinskih bakterij na treh kompleksnih gojiščih.

Oznaka seva	RAE	GY	MA
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV382	+	+	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV429	+	+	+
<i>Komagataeibacter</i> sp. AV436	+	+	+
<i>Komagataeibacter swingsii</i>	+	+	w
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	-	+	+
<i>Komagataeibacter medellinensis</i>	+	+	+
<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>	+	+	+
<i>Komagataeibacter nataicola</i>	+	+	+
<i>Komagataeibacter saccharivorans</i>	+	w	+
<i>Komagataeibacter kakiaceti</i>	+	-	+
<i>Komagataeibacter oboediens</i>	+	-	-
<i>Komagataeibacter intermedius</i>	+	+	+
<i>Komagataeibacter cocois</i>	+	+	na
<i>Komagataeibacter pomaceti</i>	+	+	na

Legenda: +, rast; -, ni rasti; w, šibka rast; na, nismo analizirali

Kot prikazano v preglednici 2, so vsi preiskani sevi, z izjemo referenčne vrste *K. xylinus*, kazali dobro rast na gojišču RAE po 3 dneh inkubacije pri 30°C. Rast biomase je bila očitna tudi na gojišču MA po 3 dneh inkubacije, z izjemo sevov *K. swingsii* in *K. oboediens*. Na gojišču GY nista rastla seva *K. kakiaceti* in *K. oboediens*, sev *K. saccharivorans* je kazal šibko rast, ostali preiskani sevi so na tem gojišču kazali dobro rast po 3 dneh gojenja. Zaradi teh lastnosti smo vse seve, razen referenčnega seva *K. xylinus*, pred nadaljnjim preiskovanjem gojili na gojišču RAE. Referenčni sev *K. xylinus* smo gojili na gojišču GY.

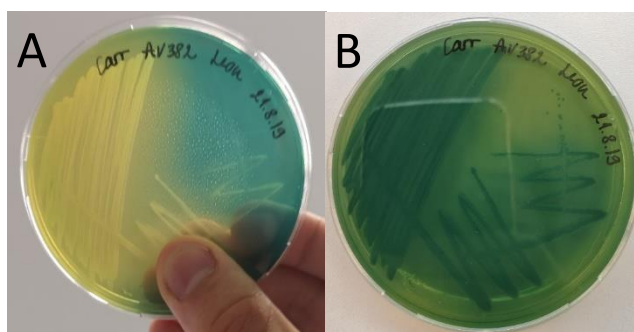
#### 4.1.2 OSNOVNE FENOTIPSE LASTNOSTI PREISKOVANIH SEVOV OCETNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Vsi novi sevi so se barvali po Gramu negativno, so bili katalaza pozitivni in oksidaza negativni, so se pojavljali v obliki samostojnih palččk in oksidirali očetno kislino (slika 4 in 5), kar je značilna lastnost rodu *Komagataeibacter* (preglednica 3). Edini sev, ki je sintetiziral celulozo, je bil *Komagataeibacter* sp. AV436 (slika 6).

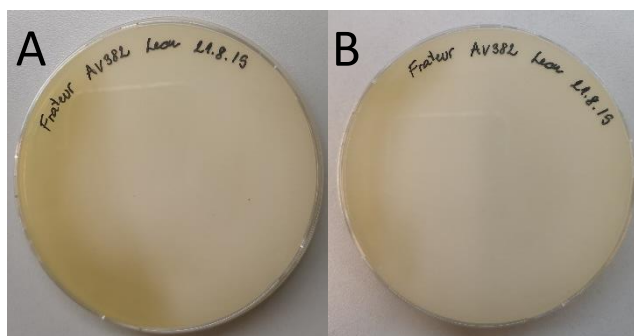
Preglednica 3: Osnovne fenotipske lastnosti preiskovanih sevov.

	AV382	AV429	AV436	<i>K. oboediens</i>
Barvanje po Gramu	-	-	-	na
Oblika	p	p	p	na
Katalazna aktivnost	+	+	+	na
Oksidazna aktivnost	-	-	-	na
Sinteza celuloze	-	-	+	na
Oksidacija očetne kisline	+	+	+	+

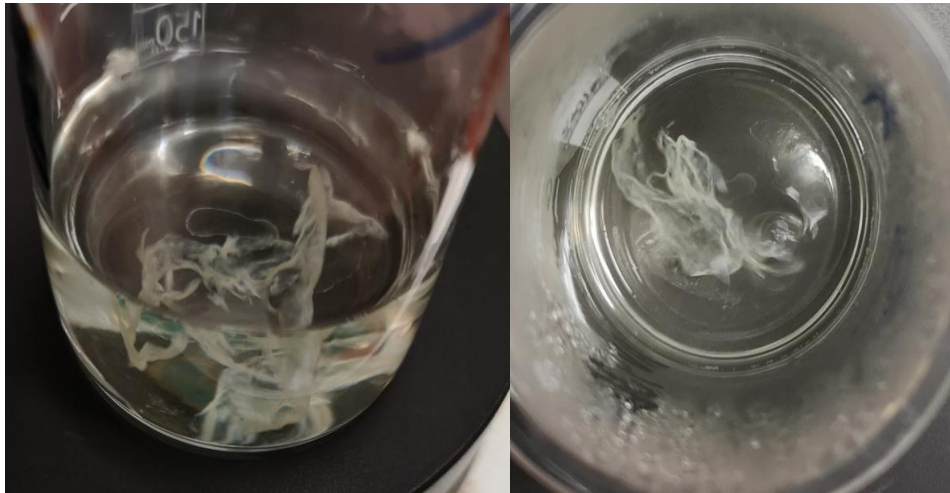
Legenda: na, nismo analizirali; p, paličasta oblika



Slika 4: Primer spremljanja sposobnosti oksidacije etanola v očetno kislino na gojišču Carr. Oksidacija etanola v očetno kislino povzroči spremembo barve pH-indikatorja po enem dnevu (A), pri nadaljnji oksidaciji očetne kisline pa je po petih dneh mogoče opaziti ponovno povrnitev barve indikatorja v prvotno (B).



Slika 5: Primer sposobnosti oksidacije očetne kisline preiskovane vrste *Komagataeibacter* sp. AV382 na gojišču Frateur po 5. (A) in 11. dnevu inkubacije pri 30 °C (B).



Slika 6: Biofilm po kuhanju v 5 M NaOH ne razpade, če je zgrajen iz celuloze. Slika prikazuje biofilm seva *Komagataeibacter* sp. AV436.

V preglednici 4 so zbrani rezultati vseh fenotipskih analiz za seve, ki smo jih preiskali v tej nalogi, z izjemo rezultatov preiskovanja sinteze 2-keto-D-glukonske in 5-keto-D-glukonske kisline, ki smo jo izvedli samo za seve *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436. Za referenčne seve smo rezultate pridobili iz objavljenih člankov.

Rezultate o preiskovanju sposobnosti sinteze 2-keto-D-glukonske kisline in 5-keto-D-glukonske smo odčitali po petih in 11 dneh namnoževanja sevov v tekočem gojišču z 2% glukozo in 2 % Na-glukonatom. Pri sevih *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV429 smo detektirali obe kislini po petem in po 11 dnevu. Pri sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 smo detektirali 5-keto-D-glukonsko kislino po 5 in 11 dnevu, 2-keto-D-glukonsko kislino pa po 5 dneh, ne pa po 11 dneh.

Testirali smo tudi sposobnost uporabe naslednjih virov ogljika: D-riboze, sorbitola, D-manitola, glicerola in 1-propanola. Vsi novi sevi očetnokislinskih bakterij so rastle v prisotnosti navedenih virov ogljika, z izjemo seva *Komagataeibacter* sp. AV436, ki je slabo rastle v prisotnosti propanola. Na vseh virih ogljika so dobro rastle vrste *K. swingsii*, *K. xylinus*, *K. sucrofermentans*, *K. pomaceti* in *K. cocois*. Vrsta *K. medellinensis* je rasla na vseh virih ogljika razen na 1-propanolu. Vrsti *K. europaeus* in *K. oboediens* nista rastle na nobenem viru ogljika. *K. nataicola* je dobro rasla ob prisotnosti manitola in glicerola, oslABLJENO ob prisotnosti riboze in sorbitola, ni pa rastle v prisotnosti 1-propanola. Vrsta *K. saccharivorans* je dobro rastle na vseh virih

ogljika razen ob prisotnosti propanola, kjer je bila rast šibka. Vrsta *K. kakiaceti* je dobro rasla ob prisotnosti manitola in propanola, pri ostalih virih ogljika smo opazili oslABLJENO rast. Vrsta *K. intermedius* je dobro rasla ob prisotnosti riboze, manitola in glicerola ter oslABLJENO ob prisotnosti sorbitola in propanola.

Noben od preiskovanih sevov ni rasel na gojišču s 30 % glukozo, prav tako tudi ne vrste *K. xylinus*, *K. sucrofermentans*, *K. europaeus*, *K. nataicola*, *K. oboediens*, *K. cocois* in *K. pomaceti*.

Ugotavljali smo tudi sposobnost rasti na gojišču Hoyer-Frateur in Asai v prisotnosti glukoze, manitola in etanola. Na gojišču Hoyer-Frateur so vsi preiskovani sevi dobro rastli ob prisotnosti glukoze in manitola. Ob prisotnosti etanola sta dobro rastla seva *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV429. Med referenčnimi sevi so ob prisotnosti glukoze, manitola in etanola dobro rastle vrste *K. xylinus*, *K. medellinensis*, *K. cocois* in *K. pomaceti*. Vrsta *K. swingsii* je dobro rastla na gojišču z glukozo in etanolom, v prisotnosti manitola pa je imela oslABLJENO rast. Vrste *K. sucrofermentans*, *K. nataicola*, *K. saccharivorans*, *K. kakiaceti* in *K. intermedius* so dobro rastle v prisotnosti glukoze in manitola, ne pa v prisotnosti etanola. Vrsta *K. oboediens* je imela oslABLJENO rast v prisotnosti glukoze in ni rasla ob prisotnosti manitola in etanola. Na gojišču Asai so vsi preiskovani sevi dobro rastli v prisotnosti glukoze in manitola, noben preiskovani sev pa ni rasel v prisotnosti etanola. Enake rezultate smo dobili tudi pri referenčnih sevih *K. swingsii*, *K. xylinus*, *K. medellinensis*, *K. sucrofermentans*, *K. nataicola*, *K. saccharivorans*, *K. intermedius* in *K. cocois*. Vrsta *K. kakiaceti* je dobro rastla v prisotnosti glukoze, slabo v prisotnosti etanola in ni rastla v prisotnosti manitola. Vrsta *K. oboediens* je dobro rastla samo v prisotnosti manitola, vrsta *K. pomaceti* pa v prisotnosti glukoze.

Vsi preiskovani sevi so dobro rastli brez etanola in očetne kisline, noben od sevov pa ni bil zmožen rasti v anaerobnih razmerah.

Preglednica 4: Fenotipske lastnosti preiskovanih vrst v primerjavi z referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter*.

Fenotipske lastnosti	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Produkcija iz D-glukoze															
2-keto-D-glukonska kislina	+	+	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>b,c</sup>	+ <sup>d</sup>	+ <sup>a</sup>	- <sup>e</sup>	+ <sup>b</sup>	- <sup>f</sup>	+ <sup>h</sup>	+ <sup>g</sup>
5-keto-D-glukonska kislina	+	+	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	+ <sup>b,c</sup>	+ <sup>d</sup>	+ <sup>a</sup>	- <sup>e</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>f</sup>	+ <sup>h</sup>	- <sup>g</sup>
Rast na virih ogljika															
D-Riboza	+	+	+	+	+	+	+	-	W	+	W	-	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	W	+	W	-	W	+	+
D-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	W	-	+	+	+
1-Propanol	+	+	W	+	+	-	+	-	-	W	+	-	W	+	+
Rast v prisotnosti 30% D-glukoze	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Sposobnost uporabe dušika iz (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> na:															
Gojišču Hoyer-Frateur z:															
D-glukozo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W	+	+	+
D-Manitolom	+	+	+	W	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	W
Etanolom	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Gojišču Asai z:															
D-Glukozo	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Manitolom	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Etanolom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-
Rast na gojišču RAE brez etanola in očetne kisline	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Rast v anaerobnih razmerah	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: 1, *Komagataeibacter* sp. AV382; 2, *Komagataeibacter* sp. AV429; 3, *Komagataeibacter* sp. AV436; 4, *K. swingsii* LMG 22125T; 5, *K. xylinus* LMG1515T; 6, *Komagataeibacter medellinensis* LMG1693T; 7, *K. sucrofermentans* LMG 18788T; 8, *K. europaeus* LMG 18890 T; 9, *K. nataicola* LMG 01536 T; 10, *K. saccharivorans* LMG1582T; 11, *K. kakiaceti* LMG26206 T; 12, *K. oboediens* LMG 18849 T; 13, *K. intermedius* LMG 18909 T; 14, *K. cocois* JCM 31140 T; 15, *K. pomaceti* T5K1; +: pozitivno; -: negativno; w: zmanjšana rast; a, podatki iz Castro in sod. (2013); b, podatki iz Sokollek in sod. (1998); c, podatki iz Sievers in sod. (1992); d, Slapšak in sod. (2013); e, Lino in sod. (2012); f, Boesch in sod. (1998); g, Škraban in sod. (2018); h, Liu in sod. (2018).

#### 4.1.3 DODATNE FENOTIPSE LASTNOSTI SEVA *Komagataeibacter* sp. AV429

Pri analiziranju genomskega zaporedja smo ugotovili več kot 70 % podobnost preiskovanega seva *Komagataeibacter* sp. AV429 s tipsko vrsto *Gluconacetobacter entanii* (preglednica 5). Ta vrsta v nobeni mednarodni zbirki ni več dostopna v obliki, ki bi omogočila namnoževanje tega seva v laboratorijskih razmerah, zaradi česar v času oblikovanja novega rodu *Komagataeibacter*, za razliko od njej sorodnih vrst, ni bila preimenovana v *Komagataeibacter entanii*. Namen naših nadaljnjih fenotipskih analiz je bil ugotoviti, če so lastnosti tega novega seva podobne lastnostim, opisane za referenčni sev v literaturnih podatkih.

Preiskovani sev *Komagataeibacter* sp. AV429 ni rasel na gojišču AE v prisotnosti 3 % etanola in 4 %, 5 %, 6 %, 7 % ali 8 % očetne kisline. Rast je bila očitna na gojišču brez očetne kisline ter na acetatu pri vrednosti pH 2,5 (slika 7). Sev je sintetiziral 2-keto-D-glukonsko kislino kot tudi 5-keto-D-glukonsko kislino. Rasel je v prisotnosti etanola in laktata, ne pa na gojišču s 30 % glukoze.

Preglednica 5: Fenotipske lastnosti preiskovanega seva *Komagataeibacter* sp. AV429.

Značilnosti	AV429
Rast na 3% (v/v) etanola v prisotnosti 4-8% očetne kisline	-
Rast brez očetne kisline	+
Rast na acetatu pri vrednosti pH 2,5	+
Homologija DNA-DNA (%)	
<i>Gluconacetobacter entanii</i> <sup>T</sup>	86,3
<i>K. xylinus</i>	23
<i>K. hansenii</i>	32,3
<i>K. europaeus</i>	24,7
Tvorba keto-glukonskih kislin iz D-glukoze	
2-Ketoglukonska kislina	+
5-Ketoglukonska kislina	+
Rast v prisotnosti	
Etanola	+
Laktata	+
30% (w/v)D-glukoze	-
Vsebnost G+C v DNA (mol%)	62,6

Legenda: +, pozitivno; -, negativno; w, zmanjšana rast



Slika 7: Rast seva *Komagataeibacter* sp. AV429 na acetatu pri vrednosti pH 2,5.

Preiskali smo tudi sposobnost seva *Komagataeibacter* AV429 za rast v gojišču AE s 4 % očetne kisline in 3 % etanola (AE 4a/3e) brez prisotne glukoze, ter v gojišču AE s 4 % očetne kisline (AE 4a) in različnimi viri ogljika (preglednica 6). Ugotovili smo, da bakterija lahko raste brez prisotnosti glukoze ali etanola na gojišču AE, prav tako raste tudi brez očetne kisline. Ob prisotnosti 1-propanola bakterija ni rastla. V gojišču AE smo testirali tudi zmožnost rasti v primeru, da smo glukozo zamenjali z različnimi viri ogljika. Bakterija je rastla v prisotnosti glicerola, sorbitola, manitola, glukonata in laktata. Slabše je rasla v prisotnosti fruktoze in maltoze, medtem ko v prisotnosti saharoze bakterija ni rastla. Tudi, če smo na gojišču AE očetno kislino zamenjali z laktatom ali glukonatom, je bakterija rastla.

Preglednica 6: Sposobnost uporabe različnih virov ogljika seva *Komagataeibacter* sp. AV429 v gojišču AE.

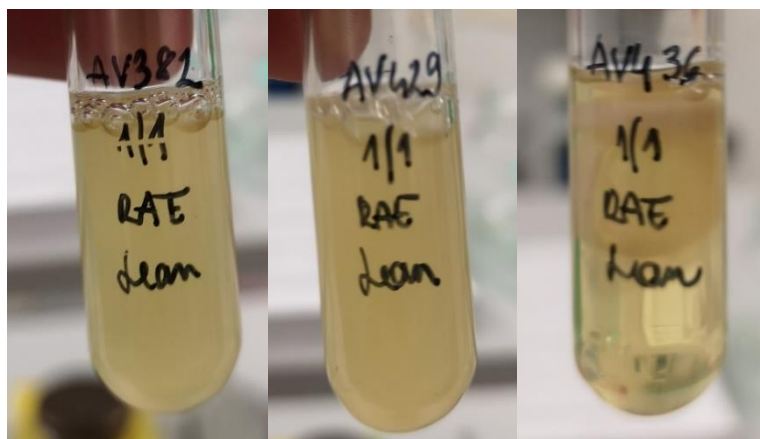
Vir ogljika	AV429
Gojišče AE (4a/3e)	
Brez glukoze	+
Gojišče AE (4a)	
Brez etanola	+
Z 1-propanolom	-
Gojišče AE (4a/3e) - glukoza zamenjana s	
Fruktozo	w
Maltozo	w
Saharozo	-
Glicerolom	+
Sorbitolom	+
Manitolom	+
Glukonatom	+
Laktatom	+
Gojišče AE (3e) brez očetne kisline	+
Gojišče AE (3e) - očetna kislina zamenjana z	
Laktatom	+
Glukonatom	+

Legenda: +, pozitivno; -, negativno; w, zmanjšana rast; 4a, 4 % očetne kisline; 3e, 3 % etanola



#### 4.1.4 RAST SEVOV V PRISOTNOSTI OCETNE KISLINE

Na gojišču RAE smo preiskovali rast sevov ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola in 2,5 % očetne kisline, katere koncentracijo smo povečevali dokler rast ni bila inhibirana (preglednica 7). Kot inokulum smo uporabili seve, ki smo jih namnožili na gojišču RAE z 1 % etanola in 1 % očetne kisline (slika 8), razen seva *K. xylinus*, ki smo ga namnožili na gojišču GY. Vsi trije preiskovani sevi so rastle v prisotnosti 1 % ali 3 % etanola in 2,5 % do 5 % očetne kisline (slika 9). Enako smo ugotovili tudi pri vrsti *K. sucrofermentans* in *K. oboediens*. V gojišču s 1 % ali 3 % etanola in od 2,5 % do 4 % očetne kisline so rastle vrste *K. swingsii*, *K. medellinensis*, *K. saccharivorans* in *K. cocois*. Sev *K. nataicola* je toleriral od 2,5 % do 4 % očetne kisline in 1 % etanola ter 3 % etanola in do 3 % očetne kisline. Sev *K. xylinus* je rastle v gojišču s 1% etanolom in 4 % očetne kisline ter v gojišču s 3 % etanola in 3 % očetne kisline. Vrsta *K. kakiaceti* je rastle v gojišču s 1 % etanola in do 5 % očetne kisline, medtem ko v prisotnosti 3 % etanola le do 4 % očetne kisline. Vrsta *K. intermedius* je rastle v gojišču s 2,5 % do 6 % očetne kisline in 1 % ali 3 % etanola (slika 10).



Slika 8: Rast preiskovanih sevov v tekočem gojišču RAE (1/1). Levo: *Komagataeibacter* sp. AV382, sredina: *Komagataeibacter* sp. AV429, desno: *Komagataeibacter* sp. AV436.

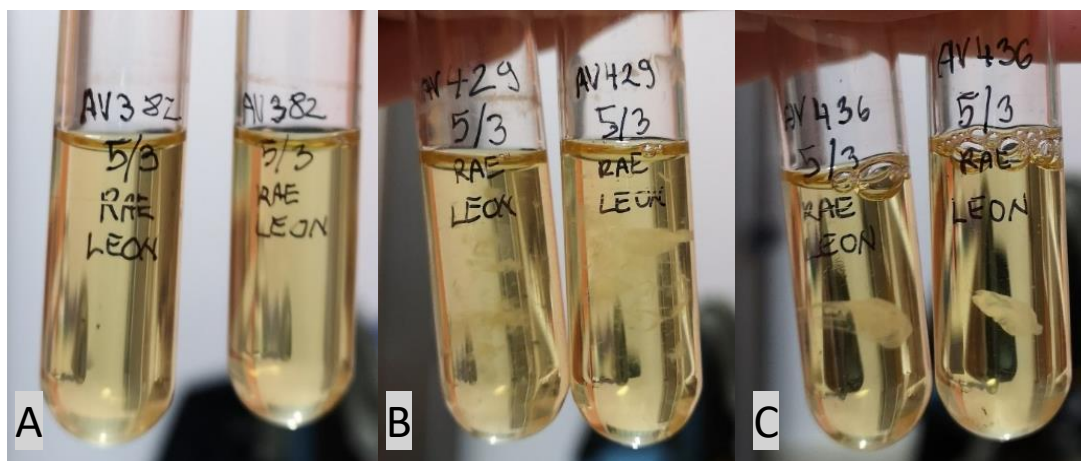
Preglednica 7: Zmožnost rasti na gojišču RAE z 1% in 3% etanolom in različno koncentracijo očetne kisline preiskovanih sevov v primerjavi z referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter*.

Rast na gojišču RAE z 1% etanolom in očetno kislino:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 <sup>a</sup>
2,5%	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3,0%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5,0%	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
6,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

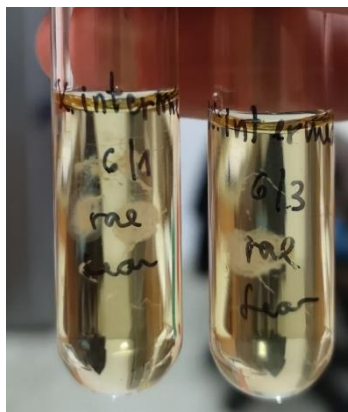
  

Rast na gojišču RAE z 3% etanolom in očetno kislino:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 <sup>a</sup>
2,5%	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3,0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,0%	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
5,0%	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
6,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7,0%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: 1, *Komagataeibacter* sp. AV382; 2, *Komagataeibacter* sp. AV429; 3, *Komagataeibacter* sp. AV436; 4, *K. swingsii* LMG 22125<sup>T</sup>; 5, *K. xylinus* LMG1515<sup>T</sup>; 6, *K. medellinensis* LMG1693<sup>T</sup>; 7, *K. sucrofermentans* LMG 18788<sup>T</sup>; 8, *K. europaeus* LMG 18890<sup>T</sup>; 9, *K. nataicola* LMG 01536<sup>T</sup>; 10, *K. saccharivorans* LMG1582<sup>T</sup>; 11, *K. kakiaceti* LMG26206<sup>T</sup>; 12, *K. oboediens* LMG 18849<sup>T</sup>; 13, *K. intermedius* LMG 18909<sup>T</sup>; 14, *K. cocois* JCM 31140<sup>T</sup>; 15, *K. pomaceti* T5K1; +: pozitivno; -: negativno; <sup>a</sup>, Podatki iz Škraban in sod. (2018).



Slika 9: Rast preiskovanih sevov v gojišču RAE s 3 % etanolom in 5 % očetno kislino. Legenda: A, *Komagataeibacter* sp. AV382; B, *Komagataeibacter* sp. AV429; C, *Komagataeibacter* sp. AV436. Vsi trije sevi oblikujejo pelet, a različnih konsistenc.



Slika 10: Rast seva *K. intermedius* v tekočem gojišču RAE v prisotnosti 1 % (leva epruveta) ali 3 % etanola (desna epruveta) in 6 % očetne kisline. Sev tvori značilen pelet.

#### 4.1.5 VRSTE MAŠČOBNIH KISLIN V CELOKUPNI BAKTERIJSKI BIOMASI

Vsi novi sevi *Komagataeibacter* spp. so po namnoževanju na gojišču RAE vsebovali največ nenasičene maščobne kisline z 18 C-atomi  $C_{18:1} \omega 7c$ , t.j. 31,41–58,88 %. Druga najbolj zastopana maščobna kislina je bila pri vseh sevih palmitinska kislina ( $C_{16:0}$ ) v razponu 9,22–16,41 %, razen pri sevu *Komagataeibacter* sp. AV382, kjer je bila na drugem mestu maščobna kislina z 19 C-atomi  $C_{19:0}$  cyclo  $\omega 8c$  (12,97 %). V sevu *Komagataeibacter* sp. AV429 sta bili med bolj zastopanimi maščobnimi kislinami še margarinska kislina  $C_{17:0}$  (10,72 %) in hidroksilirana maščobna kislina  $C_{16:0}$  2-OH (6,44 %), v sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 hidroksilirani maščobni kislini  $C_{16:0}$  2-OH (15,24 %) in  $C_{14:0}$  2-OH (13,23 %) in ravno tako v sevu *Komagataeibacter* sp. *cocois* hidroksilirani maščobni kislini  $C_{14:0}$  2-OH (9,52 %) in  $C_{16:0}$  2-OH (8,05 %).

Po analizi celokupnih maščobnih kislin iz biomase, ki smo jo namnožili na gojišču GY, je bila prevladujoča maščobna kislina v vseh sevih nenasičena maščobna kislina z 18 C-atomi  $C_{18:1} \omega 7c$  (34,39 – 61,95 %) (preglednica 9), enako kot v primeru gojišča RAE. Druga najbolj zastopana maščobna kislina je bila tudi v tem primeru palmitinska kislina ( $C_{16:0}$ ) v razponu 9,05–16,41 %, razen pri sevu *Komagataeibacter* sp. AV382, kjer je bila na drugem mestu prav tako maščobna kislina z 19 C-atomi  $C_{19:0}$  cyclo  $\omega 8c$  (16,73 %). V sevu *Komagataeibacter* sp. AV429 je bila med pogostejšimi še palmitinska kislina  $C_{16:0}$  (9,95 %),  $C_{16:0}$  2-OH (7,28 %) in  $C_{14:0}$  2-OH (5,37 %), v sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 pa palmitinska kislina  $C_{16:0}$  (16,41 %) in miristinska kislina  $C_{14:0}$  (15,80 %). V referenčnem sevu *K. cocois* so prevladovali enake

maščobne kisline po gojenju na gojišču RAE in GY: palmitinska kislina C<sub>16:0</sub> (13,16 %) in hidroksilirani maščobni kislini C<sub>16:0</sub> 2-OH (6,28 %) ter C<sub>14:0</sub> 2-OH (5,51 %).

Preglednica 8: Vsebnost celokupnih maščobnih kislin preiskovanih sevov *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 ter referenčne vrste *K. cocois* na gojišču RAE (1/1).

Maščobne kisline	AV382 (%)	AV429 (%)	AV436 (%)	<i>K. cocois</i> (%)
C <sub>13:1</sub> pri 12-13	0,16	0,29	1,72	0,37
C <sub>14:0</sub>	1,19	1,86	7,12	3,81
C <sub>14:0</sub> 2-OH	5,93	4,41	13,23	9,52
C <sub>14:0</sub> 3-OH	nd	nd	1,2	0,74
C <sub>15:0</sub> 2-OH	2,44	2,08	0,6	nd
C <sub>16:0</sub>	9,22	10,74	16,41	13,76
C <sub>16:0</sub> 2-OH	7,07	6,44	15,24	8,05
C <sub>16:0</sub> 3-OH	1,12	1,33	5,42	1,76
C <sub>17:0</sub> cyclo	1,63	nd	nd	nd
C <sub>17:0</sub>	8,22	10,72	0,81	0,03
C <sub>17:1</sub> ω6c	6,6	4,98	nd	nd
C <sub>17:1</sub> ω8c	1,19	1,11	nd	nd
C <sub>18:0</sub> 3-OH	nd	0,76	1,61	nd
C <sub>18:1</sub> ω7c	36,87	51,46	31,41	58,88
C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c	12,97	nd	4,96	nd

Legenda: nd, ni podatka.

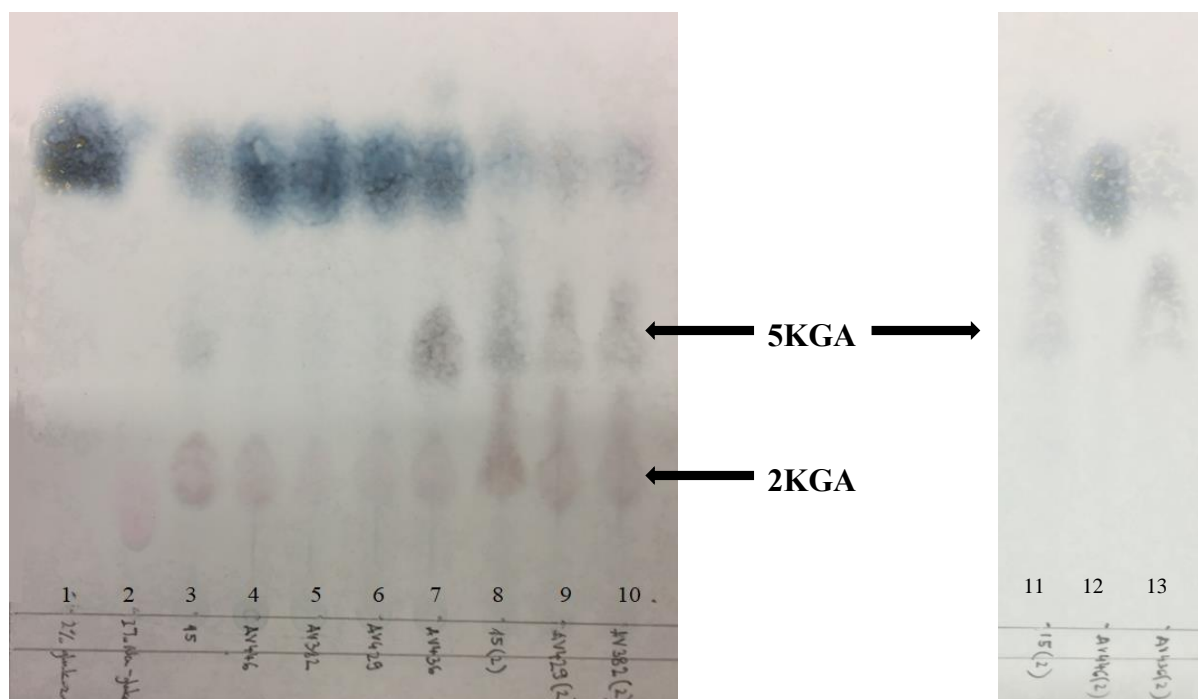
Preglednica 9: Vsebnost celokupnih maščobnih kislin preiskovanih sevov *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 ter referenčne vrste *K. cocois* na gojišču GY.

Maščobne kisline	AV382 (%)	AV429 (%)	AV436 (%)	<i>K. cocois</i> (%)
C <sub>12:0</sub>	0,34	0,29	1,52	0,24
C <sub>13:1</sub> pri 12-13	nd	0,58	2,92	0,21
C <sub>14:0</sub>	1,47	2,18	15,80	2,88
C <sub>14:0</sub> 2-OH	6,49	5,37	1,73	5,51
C <sub>14:0</sub> 3-OH	0,81	1,53	1,20	0,83
C <sub>15:0</sub> 2-OH	2,14	1,75	nd	nd
C <sub>16:0</sub>	9,05	9,59	16,41	13,16
C <sub>16:0</sub> 2-OH	7,44	7,28	2,58	6,28
C <sub>16:0</sub> 3-OH	1,66	2,49	1,99	1,72
C <sub>16:1</sub> ω6c	1,02	1,39	1,45	0,99
C <sub>17:0</sub> cyclo	3,02	nd	nd	0,2
C <sub>17:0</sub>	6,76	5,83	0,97	1,92
C <sub>17:1</sub> ω6c	2,63	3,26	0,43	0,93
C <sub>18:0</sub>	nd	nd	2,11	1,34
C <sub>18:1</sub> ω7c	34,39	53,18	43,42	61,95
C <sub>19:0</sub> cyclo ω8c	16,73	nd	4,47	nd
C <sub>19:0</sub>	1,18	nd	nd	0,09

Legenda: nd, ni podatka.

#### 4.1.6 VRSTE KETO-GLUKONSKIH KISLIN V GOJIŠČU ZA NAMNOŽEVANJE BAKTERIJ

S pomočjo tankoplastne kromatografije smo ločevali in identificirali vrste keto-glukonskih kislin, ki jih sintetizirajo sevi *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 (slika 11). Kot standard smo uporabili produkte referenčnega seva *Komagataeibacter hansenii*, za katerega je znano, da sintetizira 2-keto-D-glukoze in 5-keto-D-glukonsko kislino (Gossele in sod., 1983) ter referenčni sev *Komagataeibacter pomaceti*, ki tvori 2-keto-D-glukonsko kislino (Škraban in sod., 2018). Poleg tega smo na ploščo nanесли še 2 % raztopino D-glukoze in Na-glukonata. Preiskovanim bakterijskim vrstam, kot tudi vrstam, ki smo jih uporabili kot standard, smo preverili tvorbo glukonskih kislin po 5. in 11. dnevu namnoževanja v tekočem gojišču. Vrsti *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV429 sta po 5. dnevu sintetizirali 2-keto-D-glukonske kisline, po 11. dnevu pa še 5-keto-D-glukonsko kislino. Preiskovana vrsta *Komagataeibacter* sp. AV436 je po 5. dnevu tvorila 2-keto-D-glukonsko kislino in 5-keto-D-glukonsko kislino, po 11. dnevu inkubacije pa smo detektirali samo prisotnost 5-keto-D-glukonske kisline.

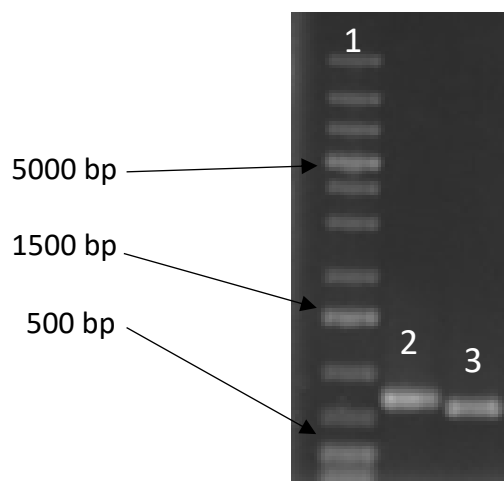


Slika 11: Slika ločitve glukonskih kislin s tankoplastno kromatografijo. Legenda: 1, 2 % Glukoza; 2, 2 % Na-glukonat; 3, *K. hansenii* (po 5 dneh); 4, *K. pomaceti* (po 5 dneh); 5, *Komagataeibacter* sp. AV382 (po 5 dneh); 6, *Komagataeibacter* sp. AV429 (po 5 dneh); 7, *Komagataeibacter* sp. AV436 (po 5 dneh); 8, *K. hansenii* (po 11 dneh); 9, *Komagataeibacter* sp. AV429 (po 11 dneh); 10, *Komagataeibacter* sp. AV382 (po 11 dneh); 11, *K. hansenii* (referenčni sev) (po 11 dneh); 12, *K. pomaceti* (referenčni sev) (po 11 dneh); 13, *Komagataeibacter* sp. AV436 (po 11 dneh).

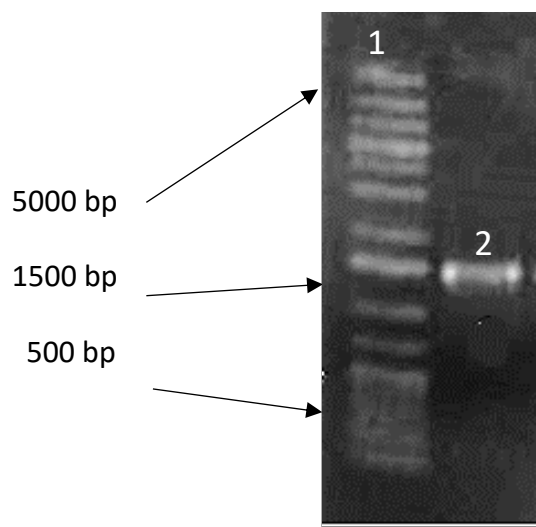
## 4.2 GENOTIPSKE LASTNOSTI

### 4.2.1 NAMNOŽENI SPECIFIČNI DNA-ODSEKI

Preiskovanim sevom smo po izolaciji DNA pomnožili medgensko regijo 16S-23S rDNA (slika 12) in gen za 16S rRNA (slika 13). PCR-pomnožke smo poslali sekvencirat podjetju Microsynth AG na Dunaj. Dobljene sekvence smo vključili v nadaljnje bioinformatične analize.



Slika 12: Primer slike agarozne gelske elektroforeze po pomnožitvi medgenske regije 16S-23S rDNA z metodo PCR. Legenda: 1, DNA-velikostni standard; 2, sev *Komagataeibacter* sp. AV436; 3, sev *Komagataeibacter* sp. AV382.



Slika 13: Primer slike agarozne gelske elektroforeze po pomnožitvi gena za 16S rRNA z metodo PCR. Legenda: 1, DNA-velikostni standard; 2, *Komagataeibacter* sp. AV436.

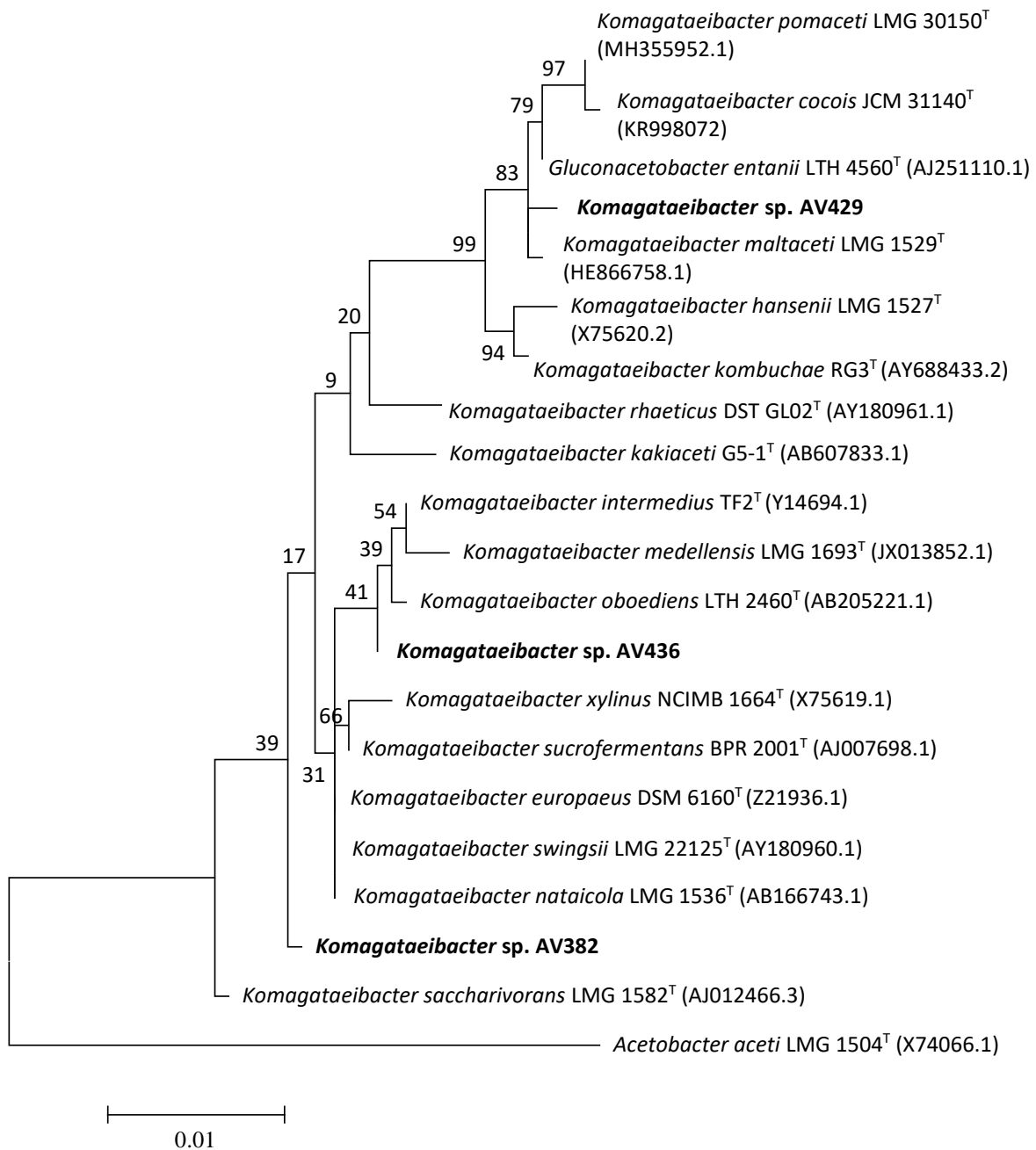
#### 4.2.2 POLOŽAJ NOVIH SEVOV V FILOGENETSKIH DREVESIH

S pomočjo programa ClustalX smo poravnali sekvence preiskovanih sevov in referenčnih sevov rodu *Komagataeibacter*. Filogenetska drevesa smo konstruirali s programom Mega7. V filogenetsko drevo na osnovi gena za 16S rRNA smo poleg preiskovanih sevov vključili vseh 17 predstavnikov rodu *Komagataeibacter*, v filogenetsko drevo konstruirano na osnovi medgenske regije 16S-23S rDNA pa smo vključili bakterijske vrste, katerih sekvenca te regije je bila do sedaj preiskana oz. smo jo lahko poiskali v njihovih genomih. Filogenetska drevesa smo konstruirali na osnovi treh različnih metod in sicer z metodo največjega verjetja, združevanja sosedov in največje varčnosti. V nabor sekvenc smo vključili še predstavnika izven rodu *Komagataeibacter*, to je tipsko vrsto *Acetobacter aceti*.

Preiskovana vrsta *Komagataeibacter* sp. AV382 je na osnovi gena za 16S rRNA gena z metodo največjega verjetja (slika 14) in združevanja sosedov (slika 15) najbolj sorodna vrstam *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter swingsii* in *Komagataeibacter nataicola*. Z metodo največje varčnosti (slika 16) pa kaže največjo sorodnost z vrsto *Komagataeibacter saccharivorans*, sledijo vrste *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter swingsii* in *Komagataeibacter nataicola*. Na podlagi medgenske regije (slike 17, 18, 19) kaže največjo sorodnost z bakterijsko vrsto *Komagataeibacter nataicola*, *Komagataeibacter xylinus* in preiskovano vrsto *Komagataeibacter* sp. AV436.

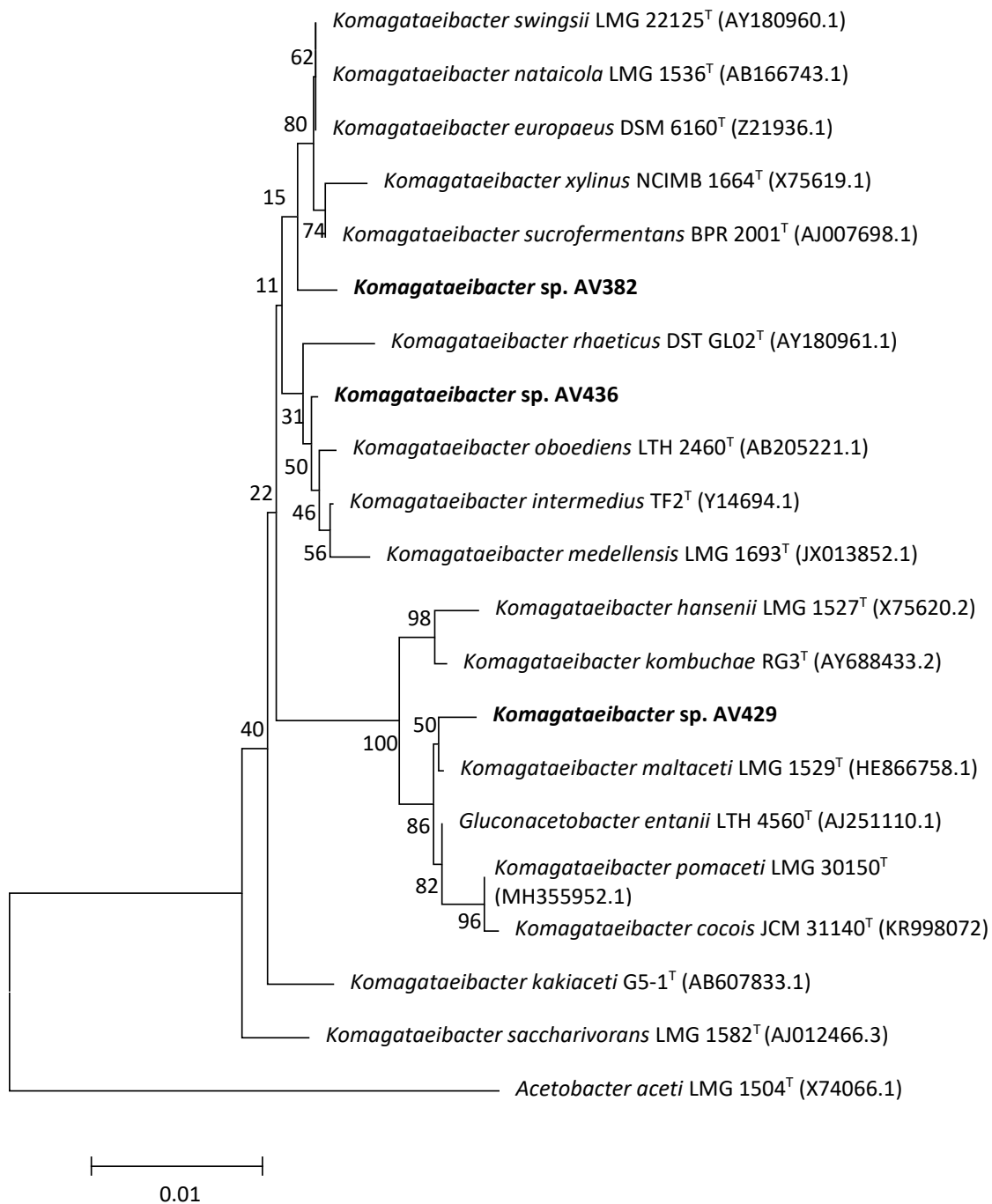
Preiskovano vrsto *Komagataeibacter* sp. AV429 na osnovi gena za 16S rRNA (slike 14, 15, 16) vse tri metode uvrščajo najbližje vrsti *Komagataeibacter maltaceti* ter *Gluconacetobacter entanii*, *Komagataeibacter pomaceti* in *Komagataeibacter cocois*. Na osnovi sekvence medgenske regije (slika 17, 18, 19) je vrsta z vsemi tremi metodami najbolj sorodna vrsti *Gluconacetobacter entanii*.

Vrsta *Komagataeibacter* sp. AV436 je na osnovi gena za 16S rRNA (slika 14, 15, 16) najbolj sorodna vrstam *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter medellinensis* in *Komagataeibacter intermedius* ne glede na metodo, ki smo jo uporabili. Na podlagi medgenske regije je vrsta najbolj sorodna sevu *Komagataeibacter xylinus* (slika 17, 18, 19).

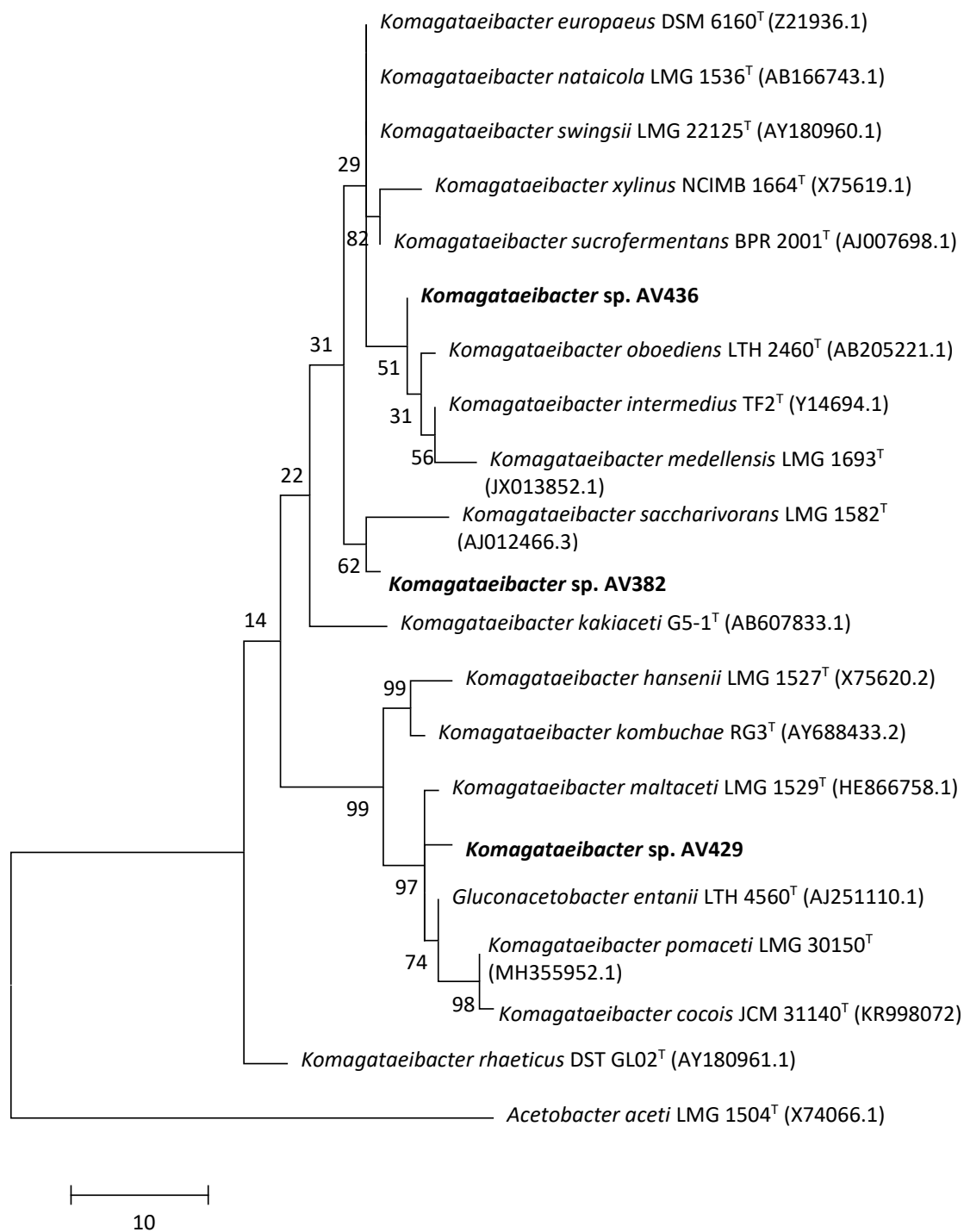


Slika 14: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov za 16S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo največjega verjetja (angl.: Maximum Likelihood). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 1 %. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).

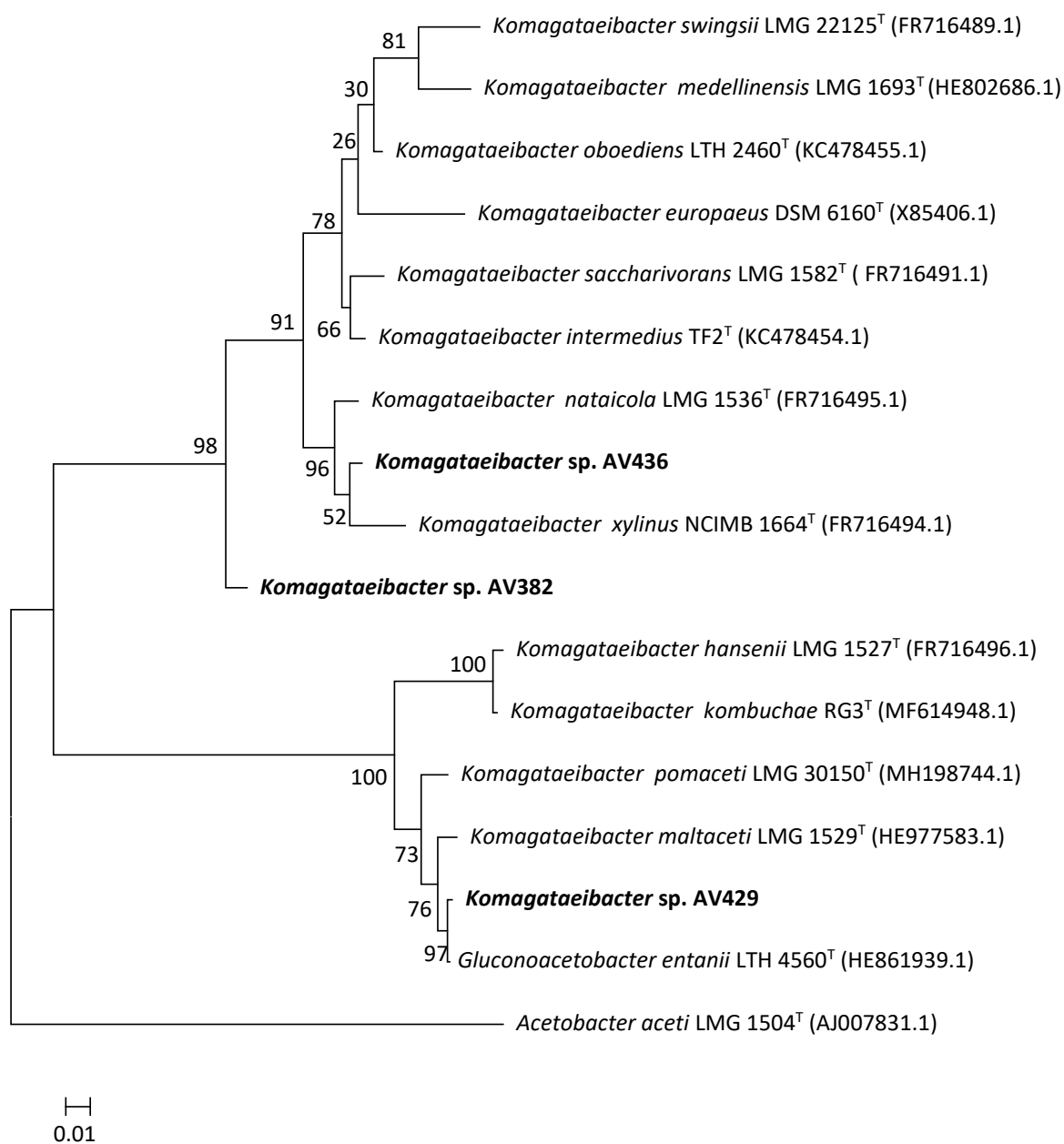




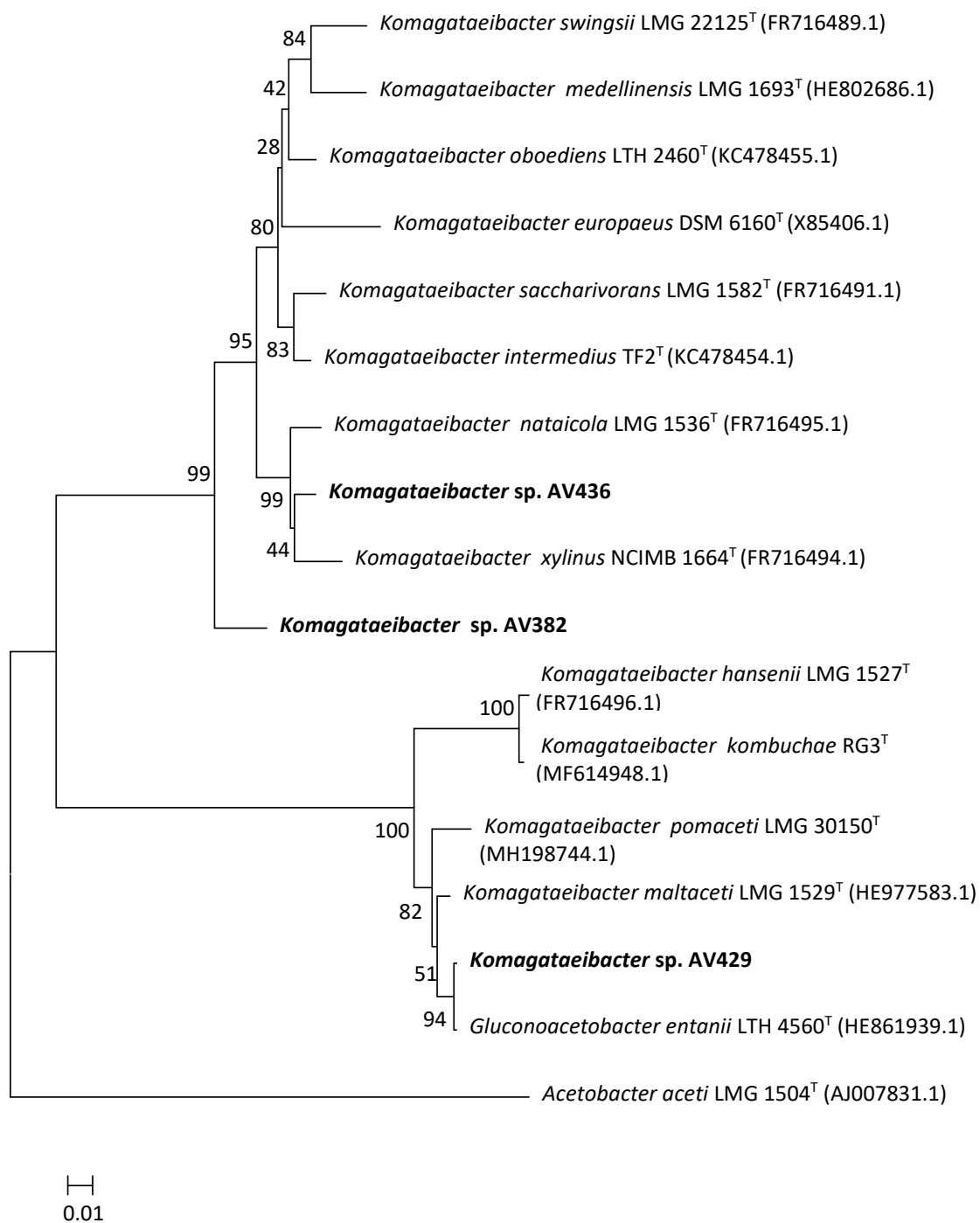
Slika 15: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov 16S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo združevanja sosedov (angl.: Neighbor Joining). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 1 %. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).



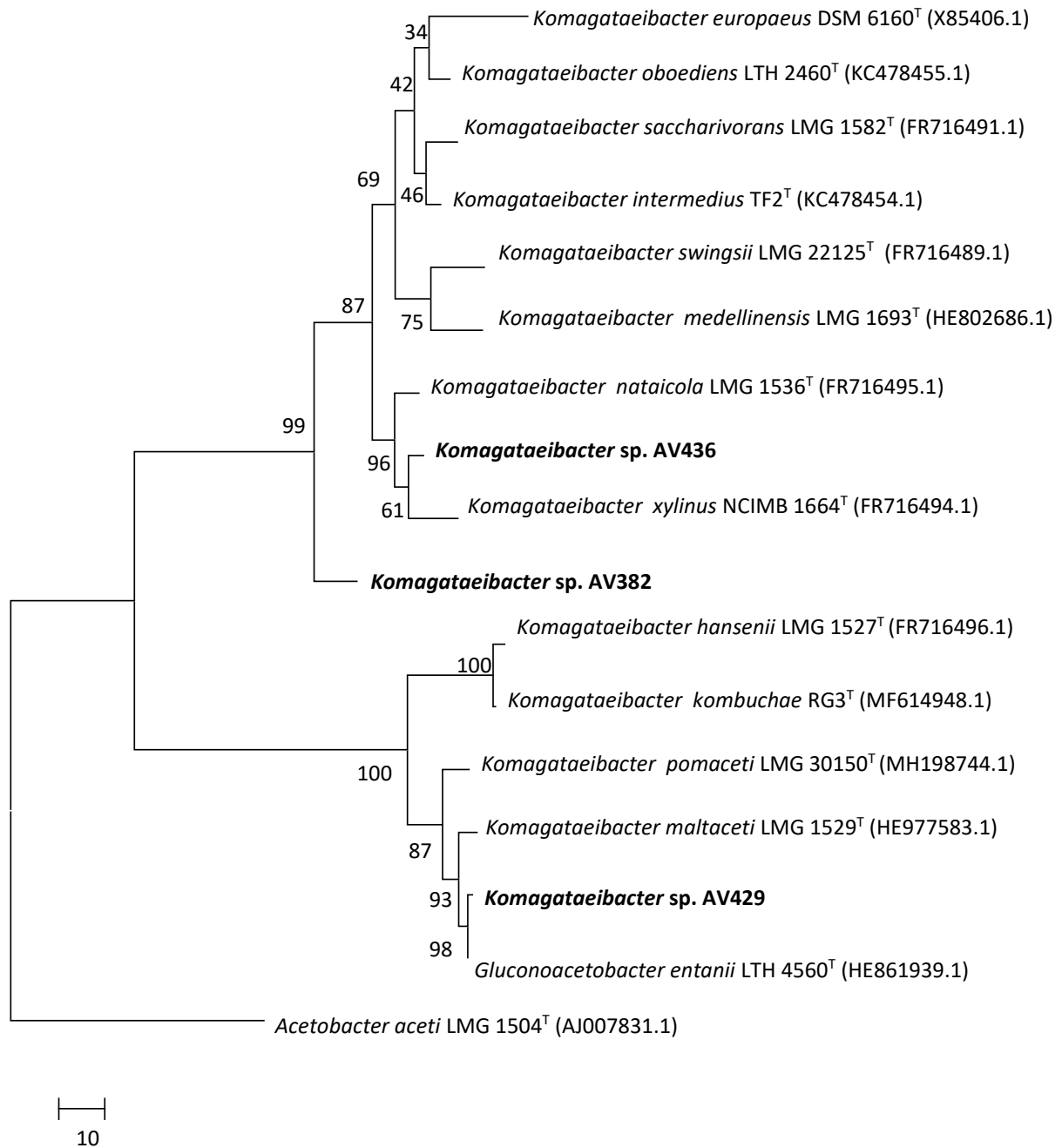
Slika 16: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc genov 16S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo največje varčnosti (angl.: Maximum Parsimony). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 10 nukleotidov. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).



Slika 17: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo največjega verjetja (angl.: Maximum Likelihood). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 1 %. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).



Slika 18: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo združevanja sosedov (angl.: Neighbor Joining). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 1 %. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).



Slika 19: Filogenetsko drevo, konstruirano na osnovi primerjave sekvenc medgenske regije 16S-23S rRNA očetnokislinskih bakterijskih vrst iz rodu *Komagataeibacter* z metodo največje varčnosti (angl.: Maximum Parsimony). Daljica prikazuje merilo za razliko v sekvenci nukleotidnega zaporedja za 10 nukleotidov. Na drevesu so prikazane vrednosti, s katerimi ovrednotimo ponovljivost vozlišč drevesa v % (angl.: Bootstrap).

#### 4.2.3 PRIMERJAVA CELOTNIH GENOMSKIH ZAPOREDIJ NA OSNOVI VREDNOSTI ANI

S programom JSpecies (Richter in Rosello-Mora, 2009) smo s primerjavo celotnih genomskih zaporedij izračunali vrednosti ANI (angl.: Average Nucleotide Identity). V analizo smo poleg preiskovanih sevov vključili vse tipske vrste *Komagataeibacter*. Vrednosti ANI smo izračunali z dvema algoritmoma, ANIb, ki omogoča primerjavo sekvenc s programskim orodjem BLAST, in ANIm, ki omogoča primerjavo sekvenc s programskih orodjem MUMer (preglednica 10 in 11). Programsko orodje MUMer je alternativa orodju BLAST in omogoča primerjavo zelo dolgih sekvenc DNA, poleg tega pa omogoča hitrejši prikaz rezultatov. Vrednost ANI za razlikovanje med vrstami je med 95 % in 96 % (Goris in sod., 2007; Kim in sod., 2014; Richter and Rosselló-Mora, 2009).

Z analizo ANIb smo ugotovili 98,03 % ujemanje genomskih zaporedij vrste *Ga. entanii* in *Komagataeibacter* sp. AV429. Vrednost ANIb med vrstama *K. cocois* in *K. pomaceti* je bila 95,62 % ter med vrstama *K. hansenii* in *K. kombuchae* 98,45 %. Podobne rezultate je pokazala tudi analiza ANIm, kjer se vrsti *Ga. entanii* in *Komagataeibacter* sp. AV429 ujemata v 98,5 % ter vrsti *K. cocois* in *K. pomaceti* v 95,72 %. Vrsti *K. hansenii* in *K. kombuchae* se v primeru vrednosti ANIm ujemata v 98,92 %.

Na osnovi analize ANI je najbližja sorodna vrsta preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV382 vrsta *K. kakiaceti*, ki se v primeru algoritma ANIb ujema s preiskovano vrsto v 88,37 % ter v primeru algoritma ANIm v 90,02%.

Preiskovana vrsta *Komagataeibacter* sp. AV436 ima na osnovi vrednosti ANIb največje ujemanje z vrsto *K. sucrofermentans* in sicer 91,66 %, na podlagi analize ANIm pa s sevom *K. xylinus*, kjer se ujema v 92,74 %.

Preglednica 10: Vrednosti ANIb preiskovanih sevov *Komagataeibacter* spp. v primerjavi z ostalimi predstavniki rodu *Komagataeibacter*.

ANIb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 AV382	•	78,07	82,58	77,56	83,07	75,61	83	88,21	75,78	77,96	80,67	82,26	82,75	77,93	81,88	82,77	82,6	83,32	82,36	75,42
2 AV429	77,88	•	78,87	98,02	78,41	85,96	78,17	78,85	85,63	91,35	75,81	77,67	78,04	84,29	77,12	76,57	77,94	78,36	77,74	83,15
3 AV436	82,53	79,19	•	78,31	83,24	75,82	82,97	83,33	75,74	78,33	81,26	90,91	82,88	78,18	82,99	81,04	91,49	83,54	91,55	75,4
4 <i>Ga. entonii</i>	77,52	98,03	78,13	•	78,74	85,8	78,03	78,83	85,68	91,17	75,82	77,53	78,14	84,34	77,17	76,57	77,39	78,37	77,53	83,08
5 <i>K. europaeus</i>	83,49	79,15	83,71	79,29	•	76,66	88,68	83,71	75,82	79,2	81,57	83,37	89,7	80,2	83,46	82,28	83,39	91,26	84,46	75,39
6 <i>K. hansenii</i>	75,52	85,94	76,09	85,75	76,41	•	76,31	76,51	98,45	85,41	75,28	75,9	75,73	82,1	75,82	75,53	75,61	75,99	75,74	82,63
7 <i>K. intermedius</i>	84,57	80,2	84,21	80,5	89,48	76,21	•	84,53	76,45	79,97	81,54	84,43	93,94	81,2	82,98	83,41	84,04	89,55	84,92	74,77
8 <i>K. kokiaceti</i>	88,37	78,73	83,24	78,56	83,49	76,14	83,15	•	76,09	78,31	81,04	82,44	82,98	78,18	82,39	83,33	82,54	83,22	82,44	75,97
9 <i>K. kombuchae</i>	75,24	85,68	75,61	85,75	75,64	98,83	75,94	76,03	•	85,47	74,76	75,41	75,58	81,92	75,3	74,99	75,28	75,82	75,28	82,1
10 <i>K. maltacetii</i>	78,11	91,47	78,37	91,26	78,4	83,38	78,48	78,47	85,64	•	76,94	78,1	77,88	84,66	77,14	76,58	78,53	78,9	78,1	83,80
11 <i>K. medellinensis</i>	80,86	76,07	81,68	76,12	82,04	74,94	82,05	81,43	74,96	76,87	•	81,57	81,79	75,32	86,58	80,41	81,59	82,17	81,32	74,86
12 <i>K. nataicola</i>	82,18	77,71	91,12	77,41	82,95	75,49	83,1	82,39	75,54	78,07	81,36	•	82,66	77,71	82,3	81,02	91,97	83,37	91,28	75,90
13 <i>K. oboediens</i>	82,68	77,87	82,57	78,5	89,28	76,07	93,78	82,69	75,56	77,94	81,42	82,73	•	78,93	82,95	82,11	82,41	88,31	83,53	75,29
14 <i>K. pomacetii</i>	78,48	84,78	77,91	84,52	78,92	82,17	78,93	78,87	82,13	84,8	75,21	78,05	78,22	•	76,73	76,68	78,04	79,37	78,38	92,32
15 <i>K. rhoeticus</i>	81,65	77,39	82,99	77,32	83,48	75,53	82,88	82,06	75,7	77,25	85,99	82,3	83,06	76,67	•	81,24	82,66	83,32	82,86	76,02
16 <i>K. saccharivorans</i>	82,66	76,59	81,21	76,51	82,29	75,49	82,68	83,27	75,42	76,42	80,22	81,07	82,05	76,36	81,44	•	81,01	82,11	81,05	75,08
17 <i>K. sucrofermentans</i>	82,62	78,09	91,66	77,37	83	75,26	83,14	82,82	75,41	78,19	81,46	92,28	82,65	77,56	82,72	81,09	•	83,51	91,69	75,49
18 <i>K. swingsii</i>	83,01	78,61	83,41	78,21	91,1	75,99	88,62	82,82	75,99	78,52	81,71	83,35	88,13	79,12	83,23	81,83	83,32	•	83,56	76,14
19 <i>K. xylinus</i>	82,32	77,7	91,39	77,63	83,43	75,38	82,99	82,27	75,38	77,63	81,18	90,95	83,24	78,12	82,78	81,12	91,33	83,6	•	75,32
20 <i>K. coccois</i>	77,03	85,63	76,91	85,6	77,06	84,24	77,08	77,53	84,09	85,57	75,96	76,53	76,79	95,62	76,75	76,67	76,49	77,30	76,45	•

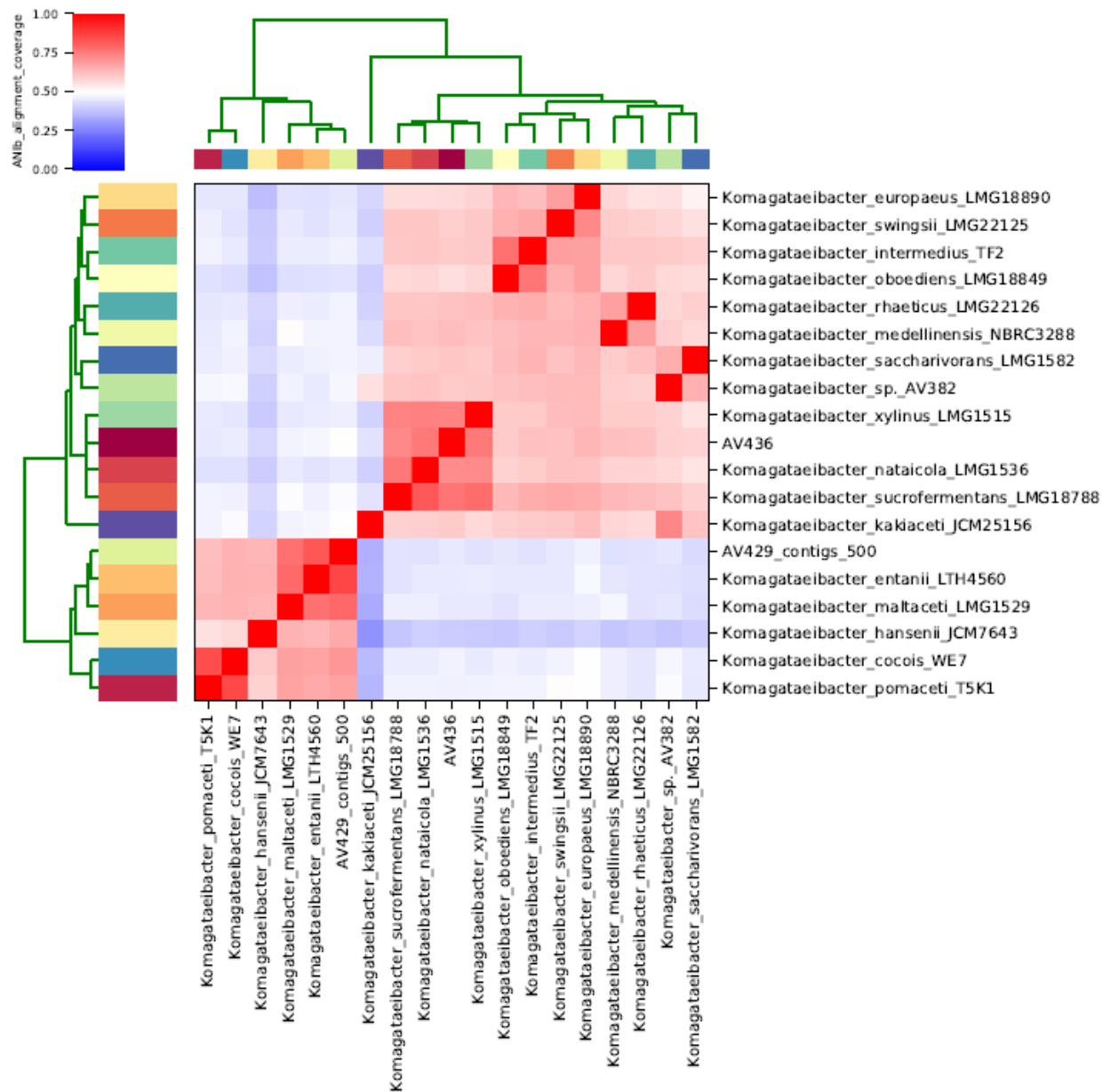
Preglednica 11: Vrednosti ANIIm preiskovanih sevov *Komagataeibacter* spp. v primerjavi z ostalimi predstavniki rodu *Komagataeibacter*.

ANIIm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1 AV382	*	86,85	86,59	86,14	86,74	84,52	86,81	90,02	84,68	86,58	85,08	86,22	86,24	87,01	85,92	85,94	86,48	86,84	86,33	85,07	
2 AV429		86,86	*	87,93	98,5	86,89	88,32	87,01	87,33	88,06	92,38	84,54	86,64	86,47	87,76	85,44	85,28	87,28	86,52	87,61	
3 AV436		86,59	87,94	*	86,86	85,07	86,72	87,09	84,82	86,85	85,61	92,2	86,31	87,09	86,57	85,4	92,56	86,89	92,75	84,93	
4 <i>Ga. entanii</i>		86,16	98,5	86,86	*	86,93	88,01	86,78	86,98	87,99	92,26	84,52	86,17	86,37	87,64	85,4	85,2	86,43	86,2	85,9	87,65
5 <i>K. europaeus</i>		86,73	86,89	86,89	86,91	*	85,5	90,32	87,28	84,83	86,71	86,02	86,58	90,59	87,39	86,72	86,09	86,63	92,23	87,03	85,28
6 <i>K. hanseii</i>		84,53	88,31	85,07	88	85,49	*	85,1	84,76	98,92	87,81	84,5	85,22	84,7	86,15	84,81	84,91	85,03	84,45	84,97	86,86
7 <i>K. intermedius</i>		86,81	87,01	86,72	86,78	90,32	85,1	*	87,11	85,25	87,2	85,78	86,92	94,73	88,23	86,4	86,51	86,87	90,36	86,97	85,03
8 <i>K. katiaceti</i>		90,02	87,33	87,09	86,97	87,28	84,76	87,11	*	84,56	86,62	85,52	86,49	86,8	86,67	86,5	86,56	86,6	87,06	86,39	85,18
9 <i>K. kombuchae</i>		84,69	88,05	84,82	87,99	84,83	98,92	85,25	84,55	*	88,01	84,28	85,13	84,71	86,12	84,47	84,75	84,99	84,54	84,72	86,81
10 <i>K. maltaceti</i>		86,58	92,38	86,84	92,25	86,71	87,81	87,21	86,63	88,01	*	86,59	86,63	86,25	87,9	85,26	85,17	87,12	86,75	86,25	87,71
11 <i>K. medellinensis</i>		85,08	84,53	85,61	84,51	86,02	84,49	85,78	85,52	84,27	86,58	*	85,61	85,7	84,7	88,09	85,06	85,5	85,98	85,53	84,80
12 <i>K. nataicola</i>		86,21	86,65	92,2	86,19	86,59	85,22	86,92	86,49	85,13	86,62	85,61	*	86,18	86,89	86,19	85,31	93,02	86,92	92,29	85,05
13 <i>K. oboediens</i>		86,23	86,46	86,31	86,36	90,59	84,7	94,73	86,8	84,7	86,25	85,69	86,17	*	86,71	86,41	85,84	86,23	89,73	86,66	84,92
14 <i>K. pomaceti</i>		87,02	87,75	87,09	87,63	87,37	86,15	88,24	86,67	86,12	87,9	84,7	86,87	86,71	*	85,11	85,06	78,04	79,37	78,38	95,72
15 <i>K. rhaeticus</i>		85,93	85,42	86,58	85,38	86,72	84,81	86,4	86,5	84,46	85,24	88,09	86,2	86,41	85,1	*	85,5	82,66	83,32	82,86	85,49
16 <i>K. saccharivorans</i>		85,94	85,28	85,4	85,2	86,08	84,91	86,5	86,57	84,75	85,17	85,07	85,3	85,84	85,05	85,51	*	81,01	82,11	81,05	85,30
17 <i>K. sucrofermentans</i>		86,49	87,28	92,56	86,44	86,64	85,04	86,86	86,6	84,99	87,13	85,5	93,01	86,24	87,17	86,32	85,35	*	86,94	92,5	85,02
18 <i>K. swingsii</i>		86,85	86,51	86,89	86,2	92,23	84,45	90,35	87,06	84,54	86,74	85,98	86,91	89,73	87,65	86,68	85,91	86,93	*	87,01	85,20
19 <i>K. xylinus</i>		86,33	86,34	92,74	85,9	87,05	84,98	86,98	86,39	84,73	86,26	85,53	92,3	86,67	87,39	86,49	85,33	92,5	87,01	*	85,04
20 <i>K. coccois</i>		85,07	87,61	84,93	87,64	85,28	86,86	85,03	85,18	86,81	87,82	84,79	85,05	84,52	95,72	85,49	85,30	85,02	85,20	85,04	*

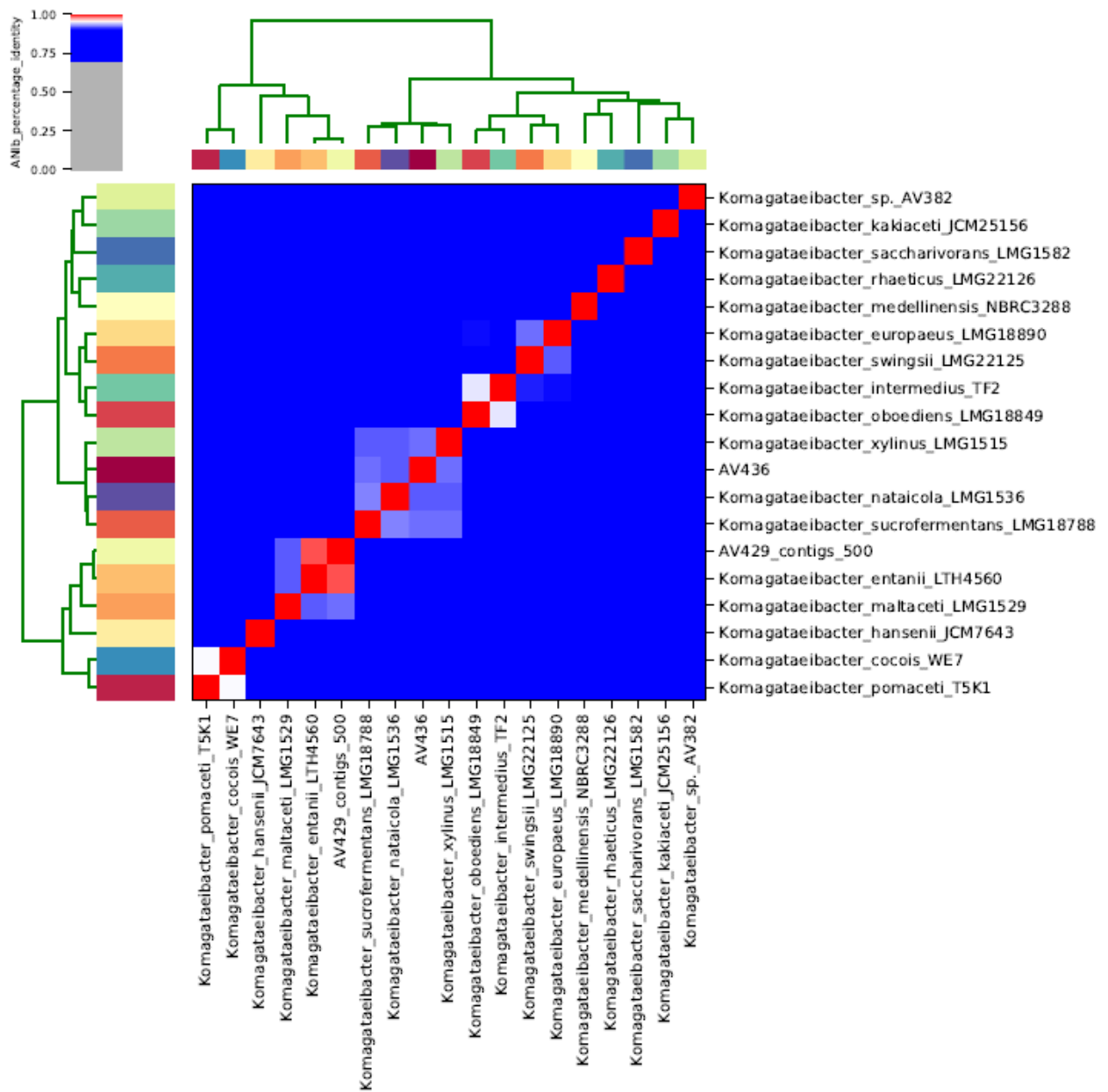


Iz izračunanih vrednosti ANIb smo oblikovali slikovne predstavitve, iz katerih je razvidna stopnja ujemanja genomskega zaporedja (angl.: Alignment Coverage) (slika 20). Rdeča barva prikazuje vsaj 50 % ujemanje genomskega zaporedja primerjanih vrst, modra barva manj kot 50 % ujemanje, bela barva pa točno 50 % ujemanje. Bledenje barve ponazarja približevanje vrednosti 50 % ujemanja. Dendrogram zgoraj in na levi strani slike prikazuje vrste, ki so hierarhično urejene v klade. Rezultati kažejo na veliko ujemanje genomskega zaporedja vrste *Gluconacetobacter entanii* s preiskovano vrsto *Komagataeibacter* sp. AV429. Prav tako se v genomskem zaporedju v velikem deležu ujemata vrsti *Komagataeibacter cocois* in *Komagataeibacter pomaceti*.

Iz vrednosti ANIb smo oblikovali slikovni prikaz, ki prikazuje delež ujemanja v odstotkih (angl.: Percentage Identity) (slika 21). Kvadrati, ki so obarvani rdečo, prikazujejo primerjavo vrst, ki se v sekvenci nukleotidnega zaporedja in vrednosti ANIb ujemajo v 95 %. Modre celice ponazarjajo bakterije, ki ne pripadajo isti vrsti. Če se vrednosti ANIb približujejo ujemanju primerjanih organizmov v 95 % je barva bela. Bolj kot barva blede, bolj so si vrste sorodne. Barvne vrstice zgoraj in na levi strani prikazujejo hierarhično združevanje rezultatov analize v dve dimenziji, vsaka barva ponazarja določeno sekvenco (Pritchard in sod., 2016). V našem primeru smo opazili precejšnje sorodstvo pri primerjavi vrst *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Gluconacetobacter entanii*. Ti vrsti sta na podlagi izračunanih vrednosti ANI izkazale 98 % podobnost, zaradi česar lahko trdimo, da gre za enaki vrsti. Precejšnjo podobnost smo opazili tudi pri primerjavi vrste *K. cocois* in *K. pomaceti*.



Slika 20: Slikovni prikaz ujemanja genomskih zaporedij preiskovanih vrst *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429, *Komagataeibacter* sp. AV436 ter referenčnih vrst rodu *Komagataeibacter*.



Slika 21: Slikovni prikaz deleža podobnosti (%) preiskovanih vrst *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 ter referenčnih vrst rodu *Komagataeibacter*.

#### 4.2.4 PRIMERJAVA GENOMOV Z *in-silico* HIBRIDIZACIJO DNA-DNA

Za izračun podobnosti genomov na osnovi *in situ* hibridizacije smo uporabili spletni kalkulator GGDC (angl.: Genome to Genome Distance Calculator) (Meier-Kolthoff, 2013). Mejna vrednost za razločevanje prokariotskih vrst je 70 %, kar pomeni, da v primeru več kot 70 % ujemanja genomov, primerjana seva lahko definiramo kot isti vrsti (Thompson in sod., 2013). Preiskovane vrste smo primerjali z preostalimi referenčnimi vrstami rodu *Komagataeibacter* (preglednica 12). V primeru seva *Komagataeibacter* sp. AV382 in AV436 je vrednost ujemanja s preostalimi vrstami med 21 % in 47,3 %. Genom seva *Komagataeibacter* sp. AV429 se najbolj ujema z genomom vrste *Gluconacetobacter entanii* in sicer 86,3 % z intervalom zaupanja 83,7 % - 88,6 %.















Preglednica 12: Rezultati *in silico* hibridizacije DNA-DNA (DDH) sevov *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436 z referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter* in *Gluconacetobacter entanii*.

DDH	AV429	<i>Ga. entanii</i>	AV382	AV436
AV429	-	86,3 (83,7 - 88,6%)	23,4 (21,1 - 25,9 %)	24,7 (22,3 - 27,1%)
<i>Ga. entanii</i>	86,3 (83,7 - 88,6%)	-	22,8 (20,5 - 25,2 %)	23,4 (21,1 - 25,9%)
AV382	23,4 (21,1 - 25,9 %)	22,8 (20,5 - 25,2 %)	-	27,3 (24,9 - 29,8%)
AV436	24,7 (22,3 - 27,1%)	23,4 (21,1 - 25,9%)	27,3 (24,9 - 29,8 %)	-
<i>K. europaeus</i>	24,7 (22,4 - 27,1%)	24,8 (22,5 - 27,3%)	28,2 (25,8 - 30,7 %)	28,6 (26,2 - 31,1%)
<i>K. hansenii</i>	32,3 (29,9 - 34,8%)	31,8 (29,4 - 34,3%)	21 (18,7 - 23,4 %)	21,4 (19,1 - 23,8%)
<i>K. intermedius</i>	24,3 (21,9 - 26,7%)	24,1 (21,7 - 26,5%)	28 (25,6 - 30,5 %)	28,1 (25,8 - 30,6%)
<i>K. kakiaceti</i>	26,6 (24,3 - 29,1%)	26,0 (23,7 - 28,5%)	37,7 (35,2 - 40,2 %)	29,5 (27,1 - 32%)
<i>K. kombuchae</i>	31,8 (29,4 - 34,3%)	31,7 (29,3 - 34,2%)	21,1 (18,8 - 23,5 %)	21,1 (18,8 - 23,5%)
<i>K. maltaceti</i>	46,1 (43,6 - 48,7%)	45,5 (42,9 - 48,1%)	23,7 (21,4 - 26,1 %)	23,5 (21,2 - 25,9%)
<i>K. medellinensis</i>	21,0 (18,8 - 23,4%)	21,1 (18,9 - 23,5%)	24,5 (22,1 - 26,9 %)	25,4 (23,1 - 27,9%)
<i>K. nataicola</i>	23,6 (21,3 - 26,0%)	23,0 (20,7 - 25,4%)	26,5 (24,2 - 29 %)	45,4 (42,8 - 47,9%)
<i>K. oboediens</i>	23,6 (21,3 - 26,1%)	23,7 (21,4 - 26,2%)	27,1 (24,8 - 29,6 %)	27,2 (24,8 - 29,7%)
<i>K. rhaeticus</i>	22,1 (19,8 - 24,5%)	21,9 (19,7 - 24,4%)	26 (23,7 - 28,5 %)	27,4 (25,1 - 29,9%)
<i>K. saccharivorans</i>	21,8 (19,5 - 24,2%)	21,7 (19,4 - 24,1%)	26,7 (24,4 - 29,2%)	25,2 (22,9 - 27,7%)
<i>K. sucrofermentans</i>	23,9 (21,6 - 26,3%)	22,7 (20,4 - 25,1%)	26,9 (24,6 - 29,4 %)	46,9 (44,3 - 49,4%)
<i>K. swingsii</i>	23,7 (21,4 - 26,2%)	23,5 (21,2 - 26,0%)	28,2 (25,8 - 30,7 %)	28,3 (25,9 - 30,8%)
<i>K. pomaceti</i>	29,5 (27,1 - 32,0%)	29,1 (26,8 - 31,6%)	23,8 (21,5 - 26,2 %)	24 (21,7 - 26,5%)
<i>K. xylinus</i>	23,0 (20,7 - 25,5%)	22,6 (20,3 - 25,0%)	26,7 (24,4 - 29,2 %)	47,3 (44,8 - 49,9%)
<i>K. cocois</i>	29,3 (26,9 - 31,8%)	29,1 (26,7 - 31,6%)	21,5 (19,2 - 23,9%)	22,2 (20 - 24,7%)

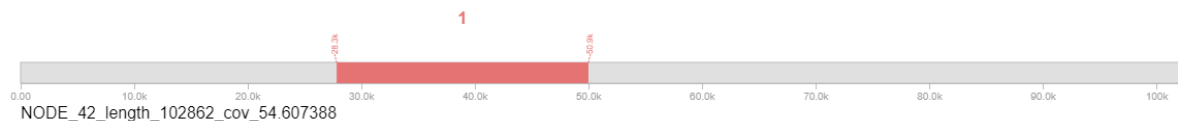
#### 4.2.5 ANALIZA VSEBNOSTI PROFAGOV V PREISKOVANIH SEVIH

Vsebnost profagov v genomu preiskovanih bakterij smo analizirali s programom Phaster, ki prikaže regije, na kateri so sekvence, ki bi lahko pripadale vključenemu profagu. Takšne regije so različno obarvane, glede na njihovo verjetnost, da predstavljajo zaporedje profaga in popolnost sekvenc: zelena predstavlja veliko verjetnost, modra manjšo verjetnost, rdeča pa predstavlja regije, ki so nepopolne. Stopnja verjetnosti, da gre za profag, je določena na osnovi števila sekvenc, ki kodirajo proteine, značilne za viruse. Sestavo vsake od regij smo natančneje preiskali in prikazali v slikah 23, 25, 26, 27, 29. V preglednici 13 so zbrani geni, ki kodirajo sestavne dele virusa.

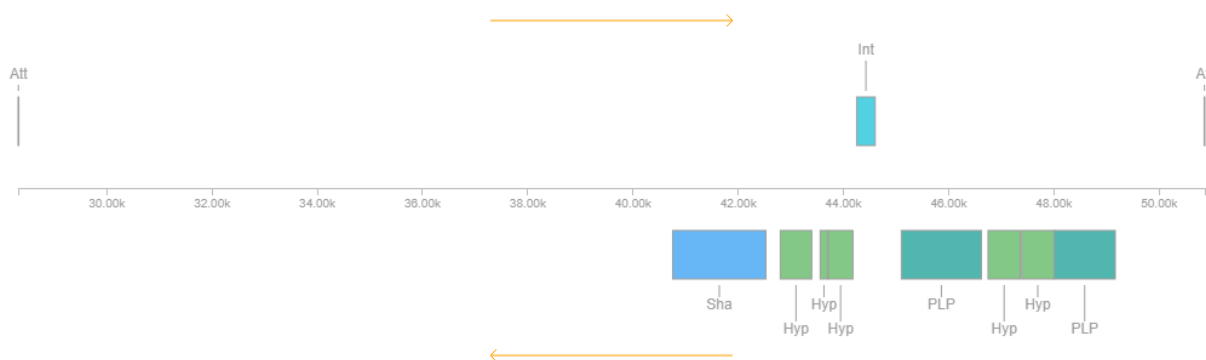
Preglednica 13: Barvna legenda genov, ki kodirajo sestavne dela virusa.

	Terminaza
	Portalni protein
	Proteaza
	Proteinski plašč
	Krčljiv del repa
	Mesto pritrditve
	Integraza
	Protein značilen za bakteriofage
	Hipotetičen protein
	Drugo
	Transposaza
	Virusne fibrile
	Bazalni del repa
	tRNA

Sev *Komagataeibacter* sp. AV382 vsebuje regijo (slika 22), ki ustreza sekvenci profaga z devetimi proteinskimi strukturami, značilnimi za viruse. Velika je 24,4 kbp in se nahaja med 28313 in 52750 bp. Vsebuje 61,42 % delež G+C. Regija vsebuje 5 hipotetičnih proteinov, značilnih za viruse, dva virusna proteina, sekvenco za integrazo in sekvenco proteina za krčljiv del repa (slika 23).

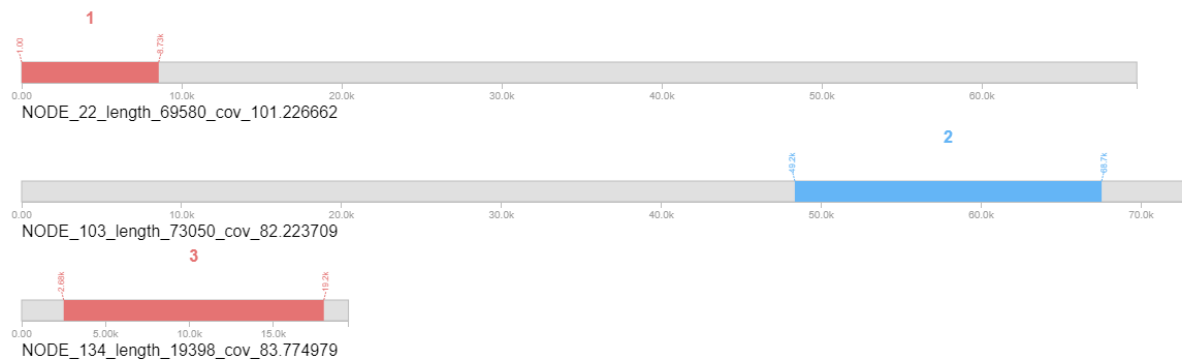


Slika 22: Pozicija profagov v genomu seva *Komagataeibacter* sp. AV382.

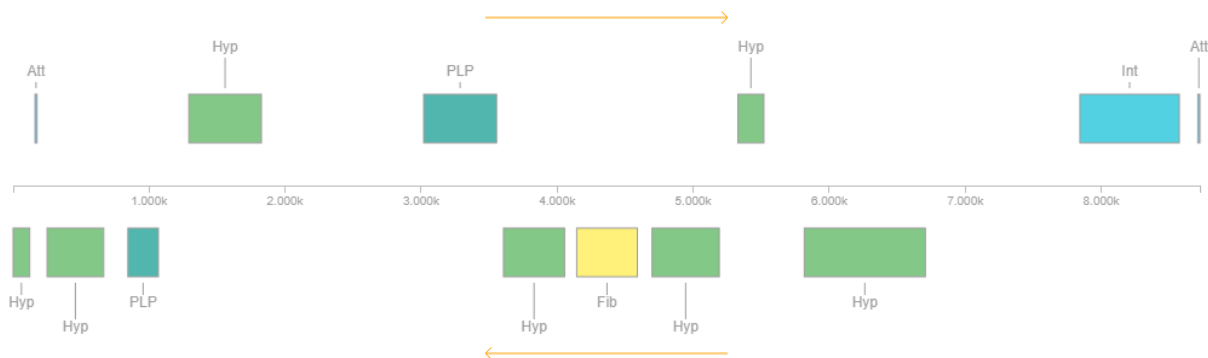


Slika 23: Proteinske strukture, ki jih vsebuje profagna regija 1 v genomu seva *Komagataeibacter* sp. AV382.

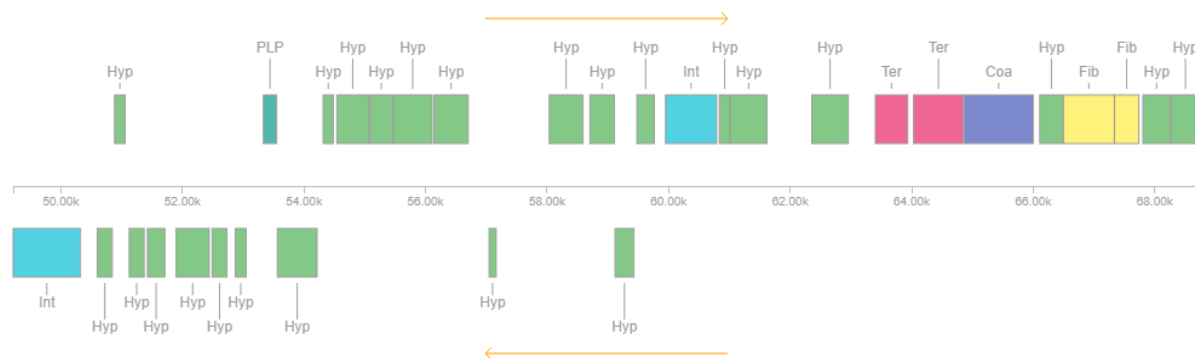
V sevu *Komagataeibacter* sp. AV429 smo identificirali tri regije, ki pripadajo sekvenci profaga (slika 24). Prva regija je velika 8,7 kbp in vsebuje 11 proteinskih enot. Nahaja se na začetku od prvega do 8710. bp ter vsebuje 56,85 % gvanina in citozina. Druga regija je velika 19,5 kbp in vsebuje 32 virusnih proteinskih enot. Nahaja se med 49215 in 68742 bp ter vsebuje 60,04 % delež gvanina in citozina. Tretja regija je velika 16,5 kbp in vsebuje 30 virusnih proteinskih enot. Nahaja se med 2678 in 19236 bp ter vsebuje 61,45 % delež G+C. Regija 1 (slika 25) vsebuje 7 hipotetičnih proteinov, značilnih za viruse, 2 virusna proteina, sekvenco integraze in sekvenco virusnih fibril. Regija 2 (slika 26) vsebuje 24 hipotetičnih proteinov, značilnih za viruse, 2 sekvenci integraze, 1 sekvenco virusnega proteina, 2 sekvenci, ki kodirajo virusne fibrile, sekvenco portalnega proteina ter 2 sekvenci terminaze. Regija 3 (slika 27) vsebuje 21 hipotetičnih proteinov, značilnih za viruse, 5 sekvenc virusnih proteinov, sekvenco transpozaze, sekvenco portalnega proteina in 2 sekvenci proteinskega plašča.



Slika 24: Pozicija profagov v genomu seva *Komagataeibacter* sp. AV429.



Slika 25: Proteinske virusne strukture, ki jih vsebuje profagna regija 1 v genomu seva *Komagataeibacter* sp. AV429.



Slika 26: Proteinske virusne strukture, ki jih vsebuje profagna regija 2 v genomu seva *Komagataeibacter* sp. AV429.





## 5 RAZPRAVA

Namen magistrskega dela je bil taksonomsko opisati tri potencialno nove vrste iz rodu *Komagataeibacter*: *Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Komagataeibacter* sp. AV436. Za doseg tega cilja smo pri sevih pregledali številne fenotipske in genotipske lastnosti ter jih primerjali z referenčnimi vrstami rodu *Komagataeibacter*.

Najprej smo preverili uspešnost rasti treh novih sevov na treh kompleksnih gojiščih (preglednica 2). Poleg gojišča RAE, ki kot vir ogljika vsebuje glukozo in etanol, smo analizirali še rast na gojišču GY, ki kot vir ogljika vsebuje samo glukozo, in gojišču MA, ki kot vir ogljika vsebuje manitol. Gojišče RAE je bilo v literaturi opisano kot najbolj primerno za namnoževanje sevov oacetnokislinskih bakterij iz kisa (Sokollek in sod., 1998), zato smo pričakovali na tem gojišču najboljšo rast. Naši rezultati pa so odkrili dobro rast vseh treh sevov na vseh treh analiziranih gojiščih, česar nismo pričakovali, saj so sevi v industrijskih bioreaktorjih za proizvodnjo kisa običajno tako prilagojeni na razmere v njem, da na gojišču brez očetne kisline in etanola v laboratorijskih razmerah ne rastejo več (Sokollek in sod., 1998). Čeprav je nekatere seve oacetnokislinskih bakterij v laboratorijskih razmerah težko namnoževati, ti novi sevi takšnih lastnosti niso imeli.

Vsi preiskovani sevi so se obarvali po Gramu negativno, imeli pozitivno katalazno aktivnost, negativno oksidazno aktivnost in so oksidirali očetno kislino, kar je značilno za rod *Komagataeibacter* (preglednica 3) (Škraban in sod., 2018).

Za rod *Komagataeibacter* je značilno tudi to, da nekateri predstavniki sintetizirajo celulozo (Cleenwerck in De Vos, 2008). Med tremi novimi sevi je samo sev *Komagataeibacter* sp. AV436 sintetiziral celulozo (preglednica 3). Nezmožnost sinteze celuloze pri ostalih sevih lahko pojasnimo z odsotnostjo genov operona *bcsABZC*, ki so potrebni za biosintezo celuloze (Valera in sod., 2015).

Pri analizi glukonskih kislin smo ugotovili, da vsi trije novi sevi tvorijo 2-keto-D-glukonsko in 5-keto-D-glukonsko kislino (preglednica 4). Pri sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 smo 2-keto-D-glukonsko kislino zaznali po 5 dnevih inkubacije, po 11 dnevih pa ne več (slika 11). Razlog za to je ta, da bakterije, ki glukonske kisline sicer izločajo v svojo okolico, lahko kisline po izrabi

drugih virov ogljika ponovno privzamejo v citoplazmo, kjer se npr. glukonske kisline reducirajo nazaj v D-glukonat, ki pa se vključi v celični metabolizem kot gradnik celične biomase (Saichana in sod., 2015). Privzem kisline v celico sicer privede do znižanja vrednosti pH, kar pa oacetnokislinske bakterije z različnimi mehanizmi lahko nevtralizirajo (Matsushita in sod., 2005; Trček in sod., 2007; Mullins in sod., 2008). Preiskovane vrste lahko tako na podlagi zmožnosti tvorbe glukonskih kislin ločimo od vrst *Komagataeibacter kakiaceti*, *Komagataeibacter sucrofermentans*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter pomaceti* in *Komagataeibacter intermedius*, saj te tvorijo le 2-keto-D-glukonsko kislino (Škraban in sod. 2018).

Zmožnost rasti smo testirali tudi na gojišču s 30 % glukozo (preglednica 4). Noben preiskovani sev na tem gojišču ni bil zmožen rasti. Previsoka koncentracija sladkorjev, v tem primeru glukoze, zmanjša vodno aktivnost gojiščca, kar inhibira rast bakterijskih sevov (Baumgarten in Feher, 2001).

Na podlagi odpornosti proti očetni kislini preiskovane seve med seboj ne moremo razlikovati, tolerirajo pa večjo koncentracijo kot večina referenčnih sevov (preglednica 7). Preiskovani sevi ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola tolerirajo koncentracijo očetne kisline do 5 % (slika 9). Največjo koncentracijo očetne kisline, ne glede na koncentracijo etanola, je tolerirala vrsta *K. intermedius* (do 6 %) (slika 10), kar je v skladu z ugotovitvami Wanga in sodelavcev (2015). Oacetnokislinske bakterije tolerirajo očetno kislino z razgradnjo le-te, transportiranjem protonov iz celice s pomočjo antiporterjev  $K^+/H^+$  ter črpanjem acetata v zunanost celice s pomočjo specifičnih črpalk. S pokritjem celične površine s polisaharidi pa oacetnokislinske bakterije lahko postavijo prepreko, ki ovira prehod očetne kisline v notranost celice (Trček in sod., 2015).

Zastopanost posameznih maščobnih kislin v bakterijski biomasi je običajno odvisna od sestave gojiščca na katerem smo bakterije namnožili (Sasser, 1990), zaradi česar smo analizo izvedli po namnoževanju bakterij na dveh različnih gojiščih: GY in RAE (preglednica 8 in 9). Pri preiskovanih vrstah in referenčnem sevu *Komagataeibacter cocois* smo detektirali največji delež maščobne kisline  $C_{18:1} \omega 7c$  (31,41 % – 61,95 %) ne glede na gojiščce, kar je v skladu z rezultati za druge vrste rodu *Komagataeibacter* (Škraban in sod., 2018). Prav tako se

zastopanost maščobnih kislin z več kot 5 % v celokupni biomasi med obema gojiščema ni bistveno razlikovala.

Primerjava fenotipskih lastnosti v preglednici 4 nam je za sev *Komagataeibacter* sp. AV382 odkrila lastnosti, ki nam omogočajo razlikovanje tega seva od ostalih vrst rodu *Komagataeibacter*. Sev producira 2-keto in 5-ketoglukonsko kislino, dobro raste na ribozi in propanolu, ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze in nima sposobnosti sinteze celuloze. Sev je sposoben uporabiti N iz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  v prisotnosti manitola na gojišču Hoyer-Frateur ali Asai. V tekočem gojišču ne oblikuje biofilma, ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola pa tolerira koncentracijo očetne kisline do 5 %.

Sev *Komagataeibacter* sp. AV436 lahko na podlagi fenotipskih lastnosti razlikujemo od ostalih vrst rodu *Komagataeibacter* po tem, da sintetizira celulozo, tvori 2-keto in 5 keto-glukonsko kislino, dobro raste na ribozi in propanolu, vendar ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze. Ob prisotnosti 1 % ali 3 % etanola tolerira do 5 % očetno kislino.

Z analizo vrednosti ANI (preglednica 10 in 11) smo ugotovili več kot 95 % podobnost seva *Komagataeibacter* sp. AV429 in *Gluconacetobacter entanii* ter več kot 70 % ujemanje genomov na osnovi *in situ* hibridizacije DNA-DNA (preglednica 12), kar dodatno potrjuje klasifikacijo obeh sevov v isto vrsto. Ker referenčni sev *G. entanii* v nobeni mednarodni zbirki ni več dostopen v kultivabilni obliki, smo sev *Komagataeibacter* sp. AV429 nadalje preiskovali z namenom, da ugotovimo, če ga lahko opišemo kot neotipsko vrsto *G. entanii*. Če primerjamo dobljene rezultate (preglednica 5) z že opisanim tipskim sevom *Ga. entanii* (Schüller in sod., 2000), ugotovimo, da se preiskovani sev *Komagataeibacter* sp. AV429 od tipskega razlikuje v tem, da ni zmožen rasti ob prisotnosti 3 % etanola in 4 – 8 % očetne kisline, da raste brez očetne kisline, in da raste na acetatu pri pH 2,5. Razlike smo opazili tudi pri izkoriščanju ogljika (preglednica 6), kajti preiskovani sev lahko raste na gojišču AE brez prisotne glukoze ali etanola, ne pa v prisotnosti 1-propanola. Razlikuje se tudi v tem, da bistveno bolje raste v gojišču AE kadar je glukoza zamenjana z glicerolom, manitolom, glukonom ali laktatom, slabo pa v primeru, ko je zamenjana s saharozo. Raste lahko tudi brez prisotne očetne kisline v gojišču AE in tudi kadar je očetna kislina zamenjana z laktatom ali glukonom (preglednica 6). V nasprotju z analizo celotnega genoma je analiza genov za 16S rRNA odkrila največjo podobnost seva *Komagataeibacter* sp. AV429 z vrsto *K. maltaceti* (99,76 %). Od vrste *K.*

*maltaceti* se razlikuje v tem, da je sposoben rasti na gojišču Hoyer-Frateur in Asai ob prisotnosti glukoze in manitola (preglednica 4), in da tolerira koncentracijo očetne kisline do 5 %, medtem ko vrsta *K. maltaceti* le do 2 % (preglednica 7) (Slapšak in sod., 2013).

Na osnovi analize ANI (preglednica 10 in 11) smo ugotovili več kot 95 % ujemanje med tipskima sevoma vrste *K. hansenii* in *K. kombuchae*, kar potrjuje ugotovitve avtorjev Škraban in sod. (2018). Več kot 95 % ujemanje smo identificirali tudi med vrstama *K. cocois* in *K. pomaceti* (preglednica 10 in 11), a obe vrsti se po literaturnih podatkih fenotipsko razlikujeta. Obe vrsti sta bili opisani leta 2018 (Škraban in sod., 2018; Liu in sod., 2018), zato je potrebno ponovno preveriti njun taksonomski status. Rezultati te raziskave kažejo, da se vrsti ne razlikujeta po sposobnosti rasti na različnih virih ogljika, rasti ob prisotnosti 30 % glukoze ter rasti brez očetne kisline in etanola. Razliko pa smo identificirali pri tvorbi glukonskih kislin, sposobnosti uporabe N iz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in toleranci proti očetni kislini. Vrsta *K. pomaceti* je slabše rasla ob prisotnosti manitola in tolerira 3 % očetne kisline ne glede na koncentracijo etanola, kar je za 1 % nižje od vrste *K. cocois*.

Preiskovana seva *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV436 na podlagi analize ANI nista izkazovala več kot 95 % podobnost z nobeno drugo vrsto (preglednica 10 in 11). Prav tako nista imeli več kot 70 % podobnost genomskega zaporedja s katerokoli drugo že opisano vrsto oacetnokislinske bakterije (preglednica 12).

Preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV382 je na osnovi primerjave nukleotidnega zaporedja celotnega genoma najbolj sorodna vrsta *Komagataeibacter kakiaceti*, kar je razvidno iz analiz vrednosti ANIb (88,73 %) (preglednica 10), ANIm (90,02 %) (preglednica 11) in *in situ* DNA-DNA hibridizaciji (37,7 %) (preglednica 12). V nasprotju s tem pa je primerjava genov za 16S rRNA odkrila največje ujemanje z bakterijsko vrsto *Komagataeibacter swingsii* (99,56 %). Sev *Komagataeibacter* sp. AV382 se od *K. swingsii* razlikuje v tem, da ne raste ob prisotnosti 30 % glukoze, in da kaže boljšo rast na gojišču Hoyer-Frateur ob prisotnosti manitola (preglednica 4). Vrsta *K. swingsii* tolerira nižjo koncentracijo očetne kisline v primerjavi s sevom *Komagataeibacter* sp. AV382 (preglednica 7). Sev *Komagataeibacter* sp. AV382 se od vrste *K. kakiaceti* razlikuje v tem, da sintetizira 2-keto in 5-keto-D-glukonsko kislino, dobro izkorišča ribozo, sorbitol in glicerol kot vir ogljika, ni sposoben rasti ob prisotnosti 30 % glukoze, raste na gojišču Hoyer-Frateur v prisotnosti etanola (preglednica 4),

ob prisotnosti 3 % etanola pa tolerira nižjo koncentracijo očetne kisline v primerjavi s *K. kakiaceti* (preglednica 7).

Preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 sta na osnovi celotnega genoma najbolj sorodni vrsti *K. sucrofermentans* in *K. xylinus* (preglednica 10 in 11). Analiza ANIb (preglednica 10) je pokazala največje ujemanje s preiskovano vrsto z vrsto *K. sucrofermentans* (91,66 %). Analiza ANIm (preglednica 11) je pokazala največje ujemanje z vrsto *K. xylinus* (92,74 %), sledi ji vrsta *K. sucrofermentans* (92,56 %). Analiza *in situ* DNA-DNA hibridizacije (preglednica 12) je pokazala največje ujemanje z bakterijsko vrsto *K. xylinus* (47,3 %), sledi ji vrsta *K. sucrofermentans* (46,9 %). Na osnovi primerjav genov za 16S rRNA se najbolj ujema s sekvenco vrste *K. oboediens* (99,78 %) in *K. intermedius* (99,78 %). Preiskovana vrsta *Komagataeibacter* sp. AV436 se od vrste *K. xylinus* razlikuje v tem, da slabo raste ob prisotnosti propanola in slabše izrabi dušik iz amonijevega sulfata ob prisotnosti etanola (preglednica 4), tolerira pa višjo koncentracijo očetne kisline (preglednica 7). Od vrste *K. sucrofermentans* se razlikuje v tem, da lahko tvorili 5-keto-D-glukonsko kislino ter izrabi dušik iz amonijevega sulfata v prisotnosti propanola (preglednica 4). Od vrste *K. oboediens* se razlikuje v tem, da je zmožna tvoriti 5-keto-D-glukonsko kislino, zelo dobro raste ne glede na vir ogljika (razen propanola), dobro izrabi dušik iz amonijevega sulfata ob prisotnosti glukoze in manitola na gojišču Hoyer-Frateur ter ob prisotnosti glukoze na gojišču Asai (preglednica 4). Od vrste *K. intermedius* se razlikuje v tem, da tvori 5-keto-D-glukonsko kislino, boljše raste ob prisotnosti sorbitola, ne raste pa ob prisotnosti 30 % glukoze (preglednica 4). Vrsta *K. intermedius* tolerira koncentracijo očetne kisline do 6 % ob 1 % ali 3 % etanolu, medtem ko sev *Komagataeibacter* sp. AV436 tolerira koncentracijo očetne kisline do 5 % (preglednica 7).

## 6 SKLEPI

- Na podlagi analize ANIb je preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV382 najbolj sorodna vrsta *Komagataeibacter kakiaceti*, s katero se v celotnem genomskem zaporedju ujema v 88,73 %.
- Na podlagi analize ANIb sta preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 najbolj sorodni vrsti *Komagataeibacter sucrofermentans*, s katero se v celotnem genomskem zaporedju ujema v 91,66 % ter *Komagataeibacter xylinus*, s katero se v celotnem genomskem zaporedju ujema v 91,55 %.
- Na podlagi analize ANIb je preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV429 najbolj sorodna vrsta *Gluconacetobacter entanii*, s katero se v celotnem genomskem zaporedju ujema v 98,3 %.
- Na podlagi *in silico* DNA-DNA hibridizacije je preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV382 sicer najbližja vrsta *Komagataeibacter kakiaceti*, a se z njo ujema v le 37,7 %.
- Na podlagi *in silico* DNA-DNA hibridizacije je preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV436 sicer najbližja vrsta *Komagataeibacter sucrofermentans*, a se z njo ujema v le 46,9 %.
- Na podlagi *in silico* DNA-DNA hibridizacije je preiskovanemu sevu *Komagataeibacter* sp. AV429 najbližje vrsta *Gluconacetobacter entanii*, s katero se na podlagi genomskega zaporedja ujema v kar 86,3 %.
- Preiskovani sev *Komagataeibacter* sp. AV429 se v mnogih fenotipskih lastnostih razlikuje of tipskega seva *Gluconacetobacter entanii*, zato sev *Komagataeibacter* sp. AV429 ni najbolj primeren kot neotipska vrsta *G. entanii*. Hipoteze 2 tako ne moremo potrditi.
- Glede na fenotipske in genotipske razlike med sevom *Komagataeibacter* sp. AV382 in referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter* lahko ugotovimo, da je sev *Komagataeibacter* sp. AV382 nova vrsta oacetnokislinske bakterije, s čimer lahko potrdimo 1. hipotezo.
- Glede na fenotipske in genotipske razlike med sevom *Komagataeibacter* sp. AV436 in referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter* lahko ugotovimo, da je sev *Komagataeibacter* sp. AV436 nova vrsta oacetnokislinske bakterije, s čimer lahko potrdimo 1. hipotezo.

## 7 POVZETEK

V magistrskem delu smo opisali dve novi vrsti očetnokislinskih bakterij, ki sta bili izolirani iz industrijskih bioreaktorjev za proizvodnjo jabolčnega kisa. Taksonomski položaj med ostalimi referenčnimi sevi rodu *Komagataeibacter* smo določili s pomočjo fenotipskih in genotipskih pristopov. Lastnosti preiskovanih bakterij smo primerjali z referenčnimi sevi, katere smo pridobili iz zbirke FNM UM in iz zbirke BCCM v Belgiji. Na genotipskem nivoju smo preiskali nukleotidna zaporedja genov za 16S rRNA in medgenske regije 16S-23S rDNA ter celotna genomska zaporedja, ki so pokazala dovolj razlik za uvrstitev sevov *Komagataeibacter* sp. AV382 in *Komagataeibacter* sp. AV436 v novi vrsti. Na podlagi analiziranega nukleotidnega zaporedja smo določili nukleotidno zaporedje, ki je najbolj podobno zaporedju preiskovane vrste *Komagataeibacter* sp. AV382, t.j. *K. kakiaceti* (ANIb 88,72 %) ter zaporedju preiskovane vrste *Komagataeibacter* sp. AV436, t.j. *K. xylinus* (ANIb 91,55 %). Kot potencialno novo vrsto smo v magistrskem delu vključili tudi sev *Komagataeibacter* sp. AV429, ki je bil izoliran skupaj s preostalima preiskovanima sevoma. Analiza genomske sekvence je sev identificirala kot vrsto *Gluconacetobacter entanii* (ANIb 98,02 %), ki pa v mednarodni zbirki mikroorganizmov ni več dostopna v kultivabilni obliki. Zaradi tega smo sev *Komagataeibacter* sp. AV429 nadalje preiskovali z namenom, da jo opišemo kot neotipsko vrsto *G. entanii*. Na osnovi analize ANI smo ugotovili več kot 95 % ujemanje med tipskima sevoma vrste *K. hansenii* in *K. kombuchae*, kar potrjuje ugotovitve avtorjev Škraban in sod. (2018). Prav tako smo ugotovili več kot 95 % ujemanje nukleotidnega zaporedja med vrstama *K. cocois* in *K. pomaceti*, vendar se obe vrsti po literaturnih podatkih fenotipsko razlikujeta. Obe vrsti sta bili opisani leta 2018 (Škraban in sod., 2018; Long-Xiang in sod., 2018), zato je potrebno ponovno preveriti njun taksonomski status. Na fenotipskem nivoju smo ugotovili, da sev *Komagataeibacter* sp. AV382 tvori 2-keto in 5-keto-D-glukonski kislini, dobro raste na ribozi, sorbitolu, manitolu, glicerolu in 1-propanolu, ne raste v prisotnosti 30 % glukoze in je sposoben uporabiti N iz  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na gojišču Hoyer-Frateur ali Asai z glukozo in manitolom, medtem ko z etanolom raste samo na gojišču Hoyer-Frateur. Na gojišču RAE lahko raste brez etanola in očetne kisline, v tekočem gojišču pa samo v planktonski obliki. Sev *Komagataeibacter* sp. AV436 lahko tvori 5-keto-D-glukonsko kislino ter raste na ribozi, sorbitolu, manitolu in glicerolu. Na propanolu smo opazili slabo rast, v prisotnosti 30 % glukoze pa sev ni rasel. Ima sposobnost izkoriščanja N iz

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na gojišču Hoyer-Frateur ali Asai z glukozo ali manitolom ter lahko raste na gojišču RAE brez etanola in očetne kisline. V tekočem gojišču raste v obliki biofilma in med preiskovanimi sevi edini sintetizira celulozo. Sev *Komagataeibacter* sp. AV429 smo na fenotipskem nivoju primerjali s tipsko vrsto *G. entanii* in ugotovili, da se od nje razlikuje v tem, da ni zmožen rasti ob prisotnosti 3 % etanola in 4 – 8 % očetne kisline, lahko pa raste brez očetne kisline, na acetatu pri pH 2,5, ob prisotnosti laktata ter lahko tvori 2-keto in 5-keto-D-glukonski kislini. Razlike smo opazili tudi pri izkoriščanju ogljika, saj preiskovani sev lahko izkorišča druge vire ogljika v gojišču AE brez prisotnostne glukoze ali etanola, raste pa tudi v prisotnosti 1-propanola. Razlikuje se tudi v tem, da bistveno bolje raste v gojišču AE kadar je glukoza zamenjana z glicerolom, manitolom, glukonatom ali laktatom, slabo pa v primeru, ko je zamenjana s saharozo.



## 8 ZAHVALA

Iz srca se v največji možni meri zahvaljujem mentorici, red. prof. dr. Janji Trček za vsako ponujeno priložnost, za sodelovanje, pomoč in vodenje pri laboratorijskem delu in pisanju magistrskega dela. Dali ste mi ogromno znanja, izkušenj ter zelo dobro podlago za naprej. Sodelovanje z vami mi je pomenilo veliko. Hvala!

Zahvaljujem se tudi dr. Juretu Škrabanu in Andreji Savič za pomoč pri izvajanju laboratorijskega dela.

Prav tako se zahvaljujem za strokovno pomoč pri analizi maščobnih kislin na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, dr. Lijani Fanedl.

Za oblikovanje slik 20 in 21 se zahvaljujem doc. dr. Tomažu Accettu z Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za kakršnokoli podporo in nasvete se iskreno zahvaljujem mami in očetu, sestri, prijateljem in vsem bližnjim, ki so me spodbujali in verjeli vame.

## 9 VIRI

- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(6), 643-653.
- Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., ... & Marchandin, H. (2010). *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 48(11), 3935-3942.
- Andrés-Barrao, C., Saad, M. M., Chappuis, M. L., Boffa, M., Perret, X., Pérez, R. O., & Barja, F. (2012). Proteome analysis of *Acetobacter pasteurianus* during acetic acid fermentation. *Journal of proteomics*, 75(6), 1701-1717.
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Pérez, R. O., Tonolla, M., & Barja, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 75-81.
- Ano, Y., Shinagawa, E., Adachi, O., Toyama, H., Yakushi, T., & Matsushita, K. (2011). Selective, high conversion of d-glucose to 5-keto-d-gluconate by *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75(3), 586-589.
- Asai, T. (1935). Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 11, 674-708.
- Augimeri, R. V., Varley, A. J., & Strap, J. L. (2015). Establishing a role for bacterial cellulose in environmental interactions: lessons learned from diverse biofilm-producing Proteobacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 1282.
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine— a review. *International journal of food microbiology*, 125(1), 60-70.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Jensen, P. Ø., Nielsen, A. K., Johansen, H. K., Homøe, P., ... & Kirketerp-Møller, K. (2015). Antibiofilm properties of acetic acid. *Advances in wound care*, 4(7), 363-372.
- Boesch, C., Trček, J., Sievers, M., & Teuber, M. (1998). *Acetobacter intermedius*, sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 21(2), 220-229.
- Baumgarten, C. M., & Feher, J. J. (2001). Osmosis and regulation of cell volume. In *Cell physiology source book* (pp. 319-355). Academic Press.

- Castro, C., Cleenwerck, I., Trček, J., Zuluaga, R., De Vos, P., Caro, G., ... & Ganan, P. (2013). *Gluconacetobacter medellinensis* sp. nov., cellulose-and non-cellulose-producing acetic acid bacteria isolated from vinegar. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(3), 1119-1125.
- Cavalcante, V. A., & Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and soil*, 108(1), 23-31.
- Cleenwerck, I., & De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *International journal of food microbiology*, 125(1), 2-14.
- Cleenwerck, I., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2010). Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10), 2277-2283.
- Cortesia, C., Vilchèze, C., Bernut, A., Contreras, W., Gómez, K., De Waard, J., ... & Takiff, H. (2014). Acetic acid, the active component of vinegar, is an effective tuberculocidal disinfectant. *MBio*, 5(2), e00013-14.
- Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., ... & Bandi, C. (2010). Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(21), 6963-6970.
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, 49, 115-119.
- De Vero, J. C., Gabayno, J. L. F., Garcia, W. O., & Sarmago, R. V. (2010). Growth evolution of Bi 2Sr 2CaCu 2O 8+ delta thin films deposited by infrared (1064 nm) pulsed laser deposition. *Physica C Superconductivity*, 470, 149-154.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., ... & Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International journal of food microbiology*, 125(1), 79-90.
- Deppenmeier, U., & Ehrenreich, A. (2009). Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 16(1-2), 69-80.
- Dutta, D., & Gachhui, R. (2006). Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1899-1903.

- Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y., & Ohta, M. (1998). Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food protection*, 61(8), 953-959.
- Fraise, A. P., Wilkinson, M. A. C., Bradley, C. R., Oppenheim, B., & Moïemen, N. (2013). The antibacterial activity and stability of acetic acid. *Journal of Hospital Infection*, 84(4), 329-331.
- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E., & Sly, L. I. (1999). Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1681-1693.
- Fuentes-Ramírez, L. E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernández, A., Jiménez-Salgado, T., Wang, E. T., Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1305-1314.
- Gillis, M., & De Ley, J. (1980). Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 30(1), 7-27.
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., & Falcone, P. M. (2009). Technological and microbiological aspects of traditional balsamic vinegar and their influence on quality and sensorial properties. *Advances in food and nutrition research*, 58, 137-182.
- Gonzales, A. (2005). Application of molecular techniques for identification of acetic acid bacteria. *Universitat Rovira I Virgili, Tarragona, Spain (PhD thesis)*.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352.
- Gosselé, F., Swings, J., & De Ley, J. (1980). A rapid, simple and simultaneous detection of 2-keto-, 5-keto- and 2, 5-diketogluconic acids by thin-layer chromatography in culture media of acetic acid bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 1(2), 178-181.
- Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., Pauwels, P., & De Ley, J. (1983). Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams of a wide variety of *Acetobacter* strains. Proposal for the improvement of the taxonomy of the genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215. *Systematic and applied Microbiology*, 4(3), 338-368.

- Gouby, A., Teyssier, C., Vecina, F., Marchandin, H., Granolleras, C., Zorngiotti, I., & Jumas-Bilak, E. (2007). *Acetobacter cibinongensis* bacteremia in human. *Emerging infectious diseases*, 13(5), 784.
- Greenberg, D. E., Porcella, S. F., Stock, F., Wong, A., Conville, P. S., Murray, P. R., ... & Zelazny, A. M. (2006). *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(11), 2609-2616.
- Hugenholtz, F., Mullaney, J. A., Kleerebezem, M., Smidt, H., & Rosendale, D. I. (2013). Modulation of the microbial fermentation in the gut by fermentable carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(2), 133-142.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L. E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martinez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing *acetobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9), 3676-3683.
- Kanchanarach, W., Theeragool, G., Inoue, T., Yakushi, T., Adachi, O., & Matsushita, K. (2010). Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1007022033-1007022033.
- Karas, M., Bachmann, D., & Hillenkamp, F. (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical chemistry*, 57(14), 2935-2939.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The family acetobacteraceae: the genera *acetobacter*, *acidomonas*, *asaia*, *gluconacetobacter*, *gluconobacter*, and *kozakia*. *The prokaryotes*, 5, 163-200.
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), 346-351.
- Komagata, K., Iino, T., & Yamada, Y. (2014). The family *acetobacteraceae*. *The Prokaryotes SE*, 396, 3-78.
- Kwon, Y. M., & Rickie, S. C. (1998). Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium*.

- Laureys, D., & De Vuyst, L. (2014). Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, *80*(8), 2564-2572.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(2), 67-78.
- Levine, A. S., & Fellers, C. R. (1940). Action of acetic acid on food spoilage microorganisms. *Journal of bacteriology*, *39*(5), 499.
- Lino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K., & Uchimura, T. (2012). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of general and applied microbiology*, *58*(3), 235-243.
- Liu, L. X., Liu, S. X., Wang, Y. M., Bi, J. C., Chen, H. M., Deng, J., ... & Li, C. F. (2018). *Komagataeibacter cocois* sp. nov., a novel cellulose-producing strain isolated from coconut milk. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *68*(10), 3125-3131.
- Loganathan, P., Sunita, R., Parida, A. K., & Nair, S. (1999). Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(1), 167-172.
- Loganathan, P., & Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(4), 1185-1190.
- Marič, L., Vaupotič A., Trček J. (2019). Sinteza bakterijskih zunajceličnih polisaharidov. *Proteus*, *81*(5), 230-235.
- Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 36, pp. 247-301). Academic Press.
- Matsushita, K., Inoue, T., Adachi, O., & Toyama, H. (2005). *Acetobacter acetii* possesses a proton motive force-dependent efflux system for acetic acid. *Journal of bacteriology*, *187*(13), 4346-4352.
- Matsushita, K., Kobayashi, Y., Mizuguchi, M., Toyama, H., Adachi, O., Sakamoto, K., & Miyoshi, H. (2008). A tightly bound quinone functions in the ubiquinone reaction sites of quinoprotein alcohol dehydrogenase of an acetic acid bacterium, *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *72*(10), 2723-2731.
- Matsutani, M., Fukushima, K., Kayama, C., Arimitsu, M., Hirakawa, H., Toyama, H., ... & Matsushita, K. (2014). Replacement of a terminal cytochrome c oxidase by ubiquinol oxidase during the evolution of acetic acid bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1837*(10), 1810-1820.

- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC bioinformatics*, 14(1), 60.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O., & Matsushita, K. (2002). A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 93(2), 192-200.
- Mullins, E. A., Francois, J. A., & Kappock, T. J. (2008). A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA): acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *Journal of bacteriology*, 190(14), 4933-4940.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., ... & Caballero-Mellado, J. (2005). Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and applied microbiology*, 28(3), 277-286.
- Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology advances*, 34(5), 827-844.
- Papalexandratou, Z., Cleenwerck, I., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). (GTG) 5-PCR reference framework for acetic acid bacteria. *FEMS microbiology letters*, 301(1), 44-49.
- Pasteur, L. (1864). Mémoire sur la fermentation acétique. In *Annales scientifiques de l'École Normale Supérieure* (Vol. 1, pp. 113-158).
- Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Orozco-Ibarra, M., & Pérez-Rojas, J. M. (2008). Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and chemical toxicology*, 46(10), 3227-3239.
- Pritchard, L., Glover, R. H., Humphris, S., Elphinstone, J. G., & Toth, I. K. (2016). Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens. *Analytical Methods*, 8(1), 12-24.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., ... & Deppenmeier, U. (2005). Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature biotechnology*, 23(2), 195-200.
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical reviews in biotechnology*, 28(2), 101-124.
- Richter, M., & Roselló-Mora, R. (2009). Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.
- Richter, M., & Roselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.

- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 1981-1987.
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in microbiology*, 23(9), 545-557.
- Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G., & Oehlbauer, M. (2009). The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics?. *Burns*, 35(5), 695-700.
- Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., & Frebortova, J. (2015). Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 33(6), 1260-1271.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *MIDI Technical note 101*.
- Schüller, G., Hertel, C., & Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2013-2020.
- Shinagawa, E., Ano, Y., Yakushi, T., Adachi, O., & Matsushita, K. (2009). Solubilization, purification, and properties of membrane-bound D-glucono- $\delta$ -lactone hydrolase from *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0812271237-0812271237.
- Sievers, M., Sellmer, S., & Teuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 386-392.
- Sievers, M., & Swings, J. (2005). The genus *Acetobacteraceae*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.—2005.—2nd Edition.—New York*, 147-171.
- Singh, O. V., & Kumar, R. (2007). Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(4), 713-722.
- Slapšak, N., Cleenwerck, I., De Vos, P., & Trček, J. (2013). *Gluconacetobacter maltaceti* sp. nov., a novel vinegar producing acetic acid bacterium. *Systematic and applied microbiology*, 36(1), 17-21.
- Snyder, R. W., Ruhe, J., Kobrin, S., Wasserstein, A., Doline, C., Nachamkin, I., & Lipschutz, J. H. (2004). *Asaia bogorensis peritonitis* identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 44(2), e15-e17.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 195-206.



- Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 935-940.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. M., Van Landschoot, A., ... & Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PloS one*, 9(4).
- Škraban, J., & Trček, J. (2017). Comparative genomics of *Acetobacter* and other acetic acid bacteria. In *Acetic Acid Bacteria* (pp. 44-70). CRC Press.
- Škraban, J., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Fanel, L., & Trček, J. (2018). Genome sequences and description of novel exopolysaccharides producing species *Komagataeibacter pomaceti* sp. nov. and reclassification of *Komagataeibacter kombuchae* (Dutta and Gachhui 2007) Yamada et al., 2013 as a later heterotypic synonym of *Komagataeibacter hansenii* (Gosselé et al. 1983) Yamada et al., 2013. *Systematic and applied microbiology*, 41(6), 581-592.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jimenez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., & Fuentes-Ramirez, L. E. (2000). Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology*, 39(1), 49-55.,
- Theel, E. S., Schmitt, B. H., Hall, L., Cunningham, S. A., Walchak, R. C., Patel, R., & Wengenack, N. L. (2012). Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3093-3095.
- Thi, L. A. P., Do, H. T., Lee, Y. C., & Lo, S. L. (2013). Photochemical decomposition of perfluorooctanoic acids in aqueous carbonate solution with UV irradiation. *Chemical engineering journal*, 221, 258-263.,
- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., & Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC genomics*, 14(1), 913.
- Toyama, H., Furuya, N., Saichana, I., Ano, Y., Adachi, O., & Matsushita, K. (2007). Membrane-bound, 2-keto-D-gluconate-yielding D-gluconate dehydrogenase from "*Gluconobacter dioxyaceticus*" IFO 3271: molecular properties and gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(20), 6551-6556.
- Trček, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 28(8), 735-745.
- Trček, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A., & Matsushita, K. (2006). Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 70(3), 366-373.

- Trček, J., Jernejc, K., & Matsushita, K. (2007). The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles*, 11(4), 627-635.
- Trček, J. (2014). Očetnokislinske bakterije imajo številne zanimive lastnosti. *Proteus*, 76(5), 199-202.
- Trček, J., & Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of food microbiology*, 196, 137-144.
- Trček, J., Mira, N. P., & Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6215-6229.
- Tuuminen, T., Heinäsmäki, T., & Kerttula, T. (2006). First report of bacteremia by *Asaia bogorensis*, in a patient with a history of intravenous-drug abuse. *Journal of clinical microbiology*, 44(8), 3048-3050.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., & Mateo, E. (2015). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3), 1349-1361.
- Wang, B., Shao, Y., & Chen, F. (2015). Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 255-263.
- Wieme, A. D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., & Vandamme, P. (2014). Effects of growth medium on matrix-assisted laser desorption–ionization time of flight mass spectra: a case study of acetic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4), 1528-1538.
- Yamada, Y., Nakazawa, E., Nozaki, A., & Kondô, K. (1969). Characterization of *Acetobacter xylinum* by ubiquinone system. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33(11), 1659-1661.
- Yamada, Y. (1983). *Acetobacter xylinus* sp. nov., nom. rev., for the cellulose-forming and cellulose-less, acetate-oxidizing acetic acid bacteria with the Q-10 system. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 29(5), 417-420.
- Yamada, Y., Hoshino, K. I., & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(8), 1244-1251.

- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., ... & Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the *alpha-Proteobacteria*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2), 823-829.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H. T. L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of general and applied microbiology*, 58(5), 397-404.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Thi Lan Vu, H., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2013). *Komagataeibacter* gen. nov. *List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, Validation list*, (149), 1-5.
- Yetiman, A. E., & Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International journal of food microbiology*, 204, 9-16.

## 10 PRILOGE

### Priloga 1: Izjava o avtorstvu in istovetnosti tiskane in elektronske oblike magistrskega dela

UNIVERZA V MARIBORU

FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO

#### **IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE MAGISTRSKEGA DELA**

Ime in priimek študent-a/-ke: Leon Marič

Študijski program: Biologija in ekologija z naravovarstvom

Naslov zaključnega dela: Taksonomska opredelitev oacetnokislinskih bakterij  
*Komagataeibacter* sp. AV382, *Komagataeibacter* sp. AV436 in *Komagataeibacter* sp.  
AV429

Mentor: red. prof. dr. Janja Trček

Podpisan-i/-a študent/-ka Leon Marič

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentor-ja/-ice oz. somentor-ja/-ice;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v magistrskem delu in jih v magistrskem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v magistrskem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo noddal/-a za objavo v DKUM.

Uveljavljam permissivnejšo obliko licence Creative Commons: \_\_\_\_\_ (navedite obliko)

**Začasna nedostopnost:**

Zaključno delo zaradi zagotavljanja konkurenčne prednosti, zaščite poslovnih skrivnosti, varnosti ljudi in narave, varstva industrijske lastnine ali tajnosti podatkov naročnika: \_\_\_\_\_ (naziv in naslov naročnika/institucije) ne sme biti javno dostopno do \_\_\_\_\_ (datum odloga javne objave ne sme biti daljši kot 3 leta od zagovora dela). To se nanaša na tiskano in elektronsko obliko zaključnega dela.

---

Temporary unavailability:

To ensure competition competition priority, protection of trade secrets, safety of people and nature, protection of industrial property or secrecy of customer's information, the thesis \_\_\_\_\_ must not be accessible to the public till \_\_\_\_\_ (delay date of thesis availability to the public must not exceed the period of 3 years after thesis defense). This applies to printed and electronic thesis forms.

---

Datum in kraj: \_\_\_\_\_

Podpis študent-a/-ke:

Podpis mentor-ja/-ice: \_\_\_\_\_

(samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)

Ime in priimek ter podpis odgovorne osebe naročnika in žig:

\_\_\_\_\_

(samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)