

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janko RAKUŠA

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA
PROIZVODNJO N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio* sp.
DSM14379**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Janko RAKUŠA

**VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PROIZVODNJO N₂O PRI
BAKTERIJI *Vibrio* sp. DSM14379**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PRODUCTION
OF N₂O IN *Vibrio* sp. DSM14379**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je dne 13.5.2010 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Davida Stoparja, za somentorico dr. Tjašo Danevčič in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Somentorica: dr. Tjaša Danevčič

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Tjaša Danevčič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Janko Rakuša

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.22 + 579.26:579.843:574 (043) = 163.6
- KG ekologija mikroorganizmov / *Vibrio sp.* / didušikov oksid / toplogredni plini / denitrifikacija / nitrifikacija / nitrati / acetilen / okoljski dejavniki
- AV RAKUŠA, Janko
- SA STOPAR, David (mentor) / DANEVČIČ, Tjaša (somentorica) / MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2010
-
- IN VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA PROIZVODNJO N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.* DSM14379
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 31 str., 2 pregl., 7sl., 0 pril., 33 vir.
- IJ SI
-
- JI sl/en
- AI N₂O je toplogredni plin. Njegova produkcija pri bakteriji *Vibrio sp.* DSM14379, ki je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka, ni poznana. V diplomskem delu smo preučili ali in v kolikšnih količinah bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja N₂O ter proizvodnjo primerjali s proizvodnjo njegovih najbližjih sorodnikov: *Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581 ter pravim denitrifikatorjem bakterijo *Pseudomonas stutzeri* JM300. Bakterijske kulture smo gojili v bogatem oziroma minimalnem gojišču v Hungatovih epruvetah v anaerobnih pogojih. Rezultati kažejo, da bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 učinkoviteje proizvaja N₂O, kot njeni najbližji sorodniki *Vibrio gazogenes*, *Vibrio rhizosphaerae* in *Vibrio ruber*, vendar manj učinkovito, kot pravi denitrifikator bakterija *Pseudomonas stutzeri* v prisotnosti acetilena. Acetilen na produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* ni imel vpliva. Dodatek KNO₃ v bogatem gojišču je pozitivno vplival na prirast biomase. V minimalnem gojišču dodatek nitrata ni imel vpliva na rast. V bogatem gojišču z dodatkom nitrata *Vibrio sp.* vsaj osem krat učinkoviteje proizvaja N₂O kot v minimalnem gojišču. Rezultati kažejo na to, da ta bakterija izrablja redukcijo nitrata v bogatem gojišču za povečanje prirasti biomase.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.22 + 579.26:579.843:574 (043) = 163.6
- CX Ecology of microorganisms / *Vibrio sp.* / dinitrogen oxide / greenhouse gases / denitrification / nitrification / nitrates / acetylene / environmental factors
- AU RAKUŠA, Janko
- AA STOPAR, David (supervisor) / DANEVČ, Tjaša (co-advisor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2010
-
- TI INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PRODUCTION OF N₂O IN *Vibrio sp.* DSM14379
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 31 p., 2 tab., 7 fig., 0 app., 33 ref.
- LA SI
-
- AL sl/en
- AB N₂O is a greenhouse gas. Its production in bacterium *Vibrio sp.* DSM14379, which was isolated in the estuarine water of Škocjanski zatok, is unknown. In this work, we examine whether and in what quantities bacterium *Vibrio sp.* DSM14379 produces N₂O and compare this production with the productivity of its nearest relatives: *Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581, and known denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* JM300. Bacterial cultures were grown in rich or minimal growth medium in Hungate tubes under anaerobic conditions. The results indicate that the bacterium *Vibrio sp.* DSM14379 produced N₂O more efficiently than its closest relatives *Vibrio gazogenes*, *Vibrio rhizosphaerae* and *Vibrio rube* but less effective than real denitrifying bacteria *Pseudomonas stutzeri* in the presence of acetylene. Acetylene had no effect on N₂O production on *Vibrio sp.* Addition of KNO₃ to the rich medium had a positive impact on the growth of biomass while it had no effect in the minimal medium. In the rich medium containing nitrate *Vibrio sp.* produced N₂O at least eight times more efficiently than in the minimal medium. The results suggest that the bacterium exploits the reduction of nitrate in rich media to increase biomass growth.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DIDUŠIKOV OKSID	3
2.2 NITRIFIKACIJA	4
2.3 HETEROTROFNA NITRIFIKACIJA	5
2.4 DENITRIFIKACIJA	5
2.5 OCEANI KOT VIRI N ₂ O	9
2.6 BAKTERIJA <i>VIBRIO</i> SP. DSM14379, NJENI SORODNIKI IN BAKTERIJA <i>PSEUDOMONAS STUTZERI</i> JM300	9
2.6.1 Bakterija <i>Vibrio sp.</i> DSM14379	9
2.6.2 Bakterija <i>Vibrio ruber</i>	10
2.6.3 Bakterija <i>Vibrio gazogenes</i>	10
2.6.4 Bakterija <i>Vibrio rhizosphaerae</i>	10
2.6.5 Bakterija <i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300	11
2.6.6 Metabolizem nitrata in proizvodnja N ₂ O znotraj rodu <i>Vibrio</i>	11
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Kemikalije	13
3.1.2 Gojišča	13
3.1.3 Bakterijski sevi	15
3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR	15
3.2.1 Spremljanje vpliva koncentracije glukoze	16
3.2.2 Spremljanje vpliva dodanega KNO ₃	16
3.2.3 Spremljanje vpliva dodatka acetilena	16
3.2.4 Merjenje OD ₆₅₀	17
3.2.5 Merjenje količine nastalega N ₂ O	17
3.2.6 Vrednotenje biomase	17
4 REZULTATI	19
4.1 PRODUKCIJA N ₂ O PRI BAKTERIJAH <i>VIBRIO</i> SP., <i>VIBRIO GAZOGENES</i> IN <i>PSEUDOMONAS STUTZERI</i> JM300	19
4.2 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ GLUKOZE V MINIMALNEM GOJIŠČU NA PRODUKCIJO N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO</i> SP.	21
4.3 VPLIV DODATKA KNO ₃ NA PRODUKCIJO N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO</i> SP. V MINIMALNEM GOJIŠČU	22

4.4	VPLIV KONCENTRACIJE DODANEGA NITRATA NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO SP.</i> V BOGATEM GOJIŠČU	23
4.5	PRIMERJAVA PRODUKCIJE N ₂ O BAKTERIJE <i>VIBRIO SP.</i> IN NJENIH SORODNIKOV	24
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	25
5.1	PRIMERJAVA PRODUKCIJE N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO SP.</i> PRI RASTI V MINIMALNEM GOJIŠČU Z ALI BREZ DODATKA ACETILENA.....	25
5.2	VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO SP.</i>	26
5.3	VPLIV DODATKA NITRATA V GOJIŠČE NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N ₂ O PRI BAKTERIJI <i>VIBRIO SP.</i>	26
5.4	PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI PROIZVODNJE N ₂ O PRI BAKTERIJAH <i>VIBRIO SP.</i> , <i>VIBRIO GAZOGENES</i> , <i>VIBRIO RUBER</i> , <i>VIBRIO RHIZOSPHAERAE</i> IN <i>PSEUDOMONAS STUTZERI JM 300</i>	27
5.5	SKLEPI.....	29
6	POVZETEK.....	30
7	VIRI	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poti avtotrofne nitrifikacije z encimi, ki jih vključuje (Hynes in Knowles, 1984; Poth in Focht, 1985; Wood, 1986).....	4
Slika 2: Potek denitrifikacije in encimi, ki pri procesu sodelujejo (Hochstein in Tomlinson 1988).....	5
Slika 3: (A) Primerjava produkcije N ₂ O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD ₆₅₀) pri bakterijah <i>Vibrio sp.</i> , <i>Vibrio gazogenes</i> in <i>Pseudomonas stutzeri</i> na minimalnem gojišču (M9 za <i>Vibrio</i> oz. M9 za <i>E. coli</i> pri bakteriji <i>Pseudomonas stutzeri</i>) z 0,5 % (w/V) glukoze in 0,5 % (w/V) KNO ₃ z dodanim 10 % (V/V) ali brez dodanega acetilena (Acy) po 24 urah rasti pri 28 °C.....	20
Slika 4: (A) Primerjava produkcije N ₂ O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD ₆₅₀) v odvisnosti od začetne koncentracije glukoze pri <i>Vibrio sp.</i> na minimalnem gojišču M9 z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO ₃ po 24 urah rasti pri 28 °C.....	21
Slika 5: (A) Vpliv dodatka KNO ₃ na produkcijo N ₂ O in (B) vpliv dodatka KNO ₃ na optično gostoto pri 650 nm (OD ₆₅₀) (modra stolpca) in koncentracijo proteina (bordo stolpca) pri <i>Vibrio sp.</i> na minimalnem gojišču (M9) z 0,5 % (w/V) glukoze z ali brez dodanega 0,5 % (w/V) KNO ₃ po 24 urah rasti pri 28 °C.	22
Slika 6: (A) Količina proizvedenega N ₂ O in (B) Optična gostota pri 650 nm (OD ₆₅₀). v odvisnosti od koncentracije dodanega KNO ₃ pri bakteriji <i>Vibrio sp.</i> v bogatem gojišču PKS po 24 urah rasti pri 28 °C.	23
Slika 7: (A) Primerjava produkcije N ₂ O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD ₆₅₀) med vibriji v bogatem gojišču PKS z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO ₃ (<i>V. sp.</i> , <i>V. gazogenes</i> , <i>V. ruber</i> , <i>V. rhizosphaerae</i>) po 24 urah rasti pri 28 °C.....	24

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekateri inhibitorji denitrifikacije ter njihove količine v katerih so učinkoviti in reakcija, ki jo inhibirajo (Knowles, 1982).	6
Preglednica 2: Primerjava količine proizvedenega N ₂ O (n N ₂ O/m proteina [nmol/mg]) pri bakterijah <i>Vibrio sp.</i> , <i>Vibrio ruber</i> , <i>Vibrio gazogenes</i> , <i>Vibrio rhizosphaerae</i> in <i>Pseudomonas stutzeri</i> v bogatem gojišču z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO ₃ in dodatkom 10 % (V/V) acetilena ter podatki za ostale mikroorganizme iz literature.	28

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin
C ₂ H ₂	acetilen
DNP	2,4 dinitrofenol
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zeelkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland
N ₂ O	didušikov oksid
N ₂ OR	reduktaza dušikovega oksidula (encim)
NAR	nitratna reduktaza (encim)
NH ₃	amoniak
NH ₄ ⁺	amonij
NIR	nitritna reduktaza (encim)
NO	dušikov oksid
NO ₂ ⁻	nitrit
NO ₃ ⁻	nitrat
NOR	reduktaza dušikovega oksida (encim)
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
PKS	pepton-kvasni ekstrakt-sol
ppm	(parts per million) število delcev v milijonu delcev
V/V	volumsko volumski odstotki
w/V	utežno-volumski odstotki

1 UVOD

Didušikov oksid (dušikov oksidul, N₂O) je toplogredni plin s potencialom globalnega segrevanja, ki je okrog 320 krat močnejši od ogljikovega dioksida (CO₂) preračunano za obdobje 100 let. Številni avtorji se strinjajo, da sta glavni poti nastanka biogenega N₂O v vodnem okolju mikrobna avtotrofna nitrifikacija in respiratorna denitrifikacija (Bonin in sod., 2002). N₂O je stranski produkt prve stopnje nitrifikacije, kjer se amonij oksidira do nitrita (Bock in sod., 1986). V procesu denitrifikacije je N₂O eden izmed intermediatov redukcije nitrata v N₂ (Knowles, 1982). Denitrifikacijo v glavnem izvajajo fakultativni anaerobi, ki so sposobni uporabiti NO₃⁻ namesto kisika kot končni prejemnik elektronov v okolju z malo ali brez kisika. V naravi je N₂O običajen intermediat denitrifikacije, ki se potem hitro pretvori v N₂ s pomočjo N₂O reduktaze, zato se v okolje sprošča v omejenem obsegu. V okolju z nizkim pH, v okolju s prebitkom NO₃⁻ in v okolju s prisotnim kisikom je funkcija N₂O reduktaze inhibirana, zato se v teh pogojih sproščajo večje količine N₂O (Knowles, 1982). Poleg teh faktorjev N₂O reduktazo v nizkih koncentracijah inhibira tudi acetilen (Yoshinari in sod., 1977; Murray in Knowles, 2003) nekateri pesticidi, žveplove spojine in druge snovi (Knowles, 1982).

Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379, ki je bila izolirana iz Škocjanskega zatoka (Stopar in sod., 2004), reducira nitrat do plinskih produktov, kar je redkost pri bakterijah iz rodu *Vibrio*, saj te ne spadajo med tipične denitrifikatorje. V tem diplomskem delu bomo proučili pri katerih pogojih in v kolikšnih količinah bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja N₂O. Poleg tega bomo proizvodnjo N₂O pri bakteriji *Vibrio DSM14379* primerjali s proizvodnjo njenih najbližjih sorodnikov (*Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581), ter pravim denitrifikatorjem (*Pseudomonas stutzeri* JM300).

1.1 NAMEN IN OPREDELITEV PROBLEMA

V morskem okolju so estuariji in obalna področja poznani kot aktivna mesta za produkcijo N₂O. Visok vnos hranil iz kopnega in globljih delov morja stimulira mikrobne procese vključene v produkcijo N₂O. Preliminarne študije so pokazale, da bakterija *Vibrio sp.*

DSM14379, ki je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka, pretvarja nitrat v N₂O, kar je redkost pri bakterijah iz rodu *Vibrio*, vendar sta proces in vloga produkcije N₂O pri tej bakteriji slabo raziskana.

Namen diplomske naloge je:

- pokazati koliko N₂O proizvaja bakterija *Vibrio sp.* DSM14379.
- ugotoviti vpliv različnih okoljskih dejavnikov (acetilen, nitrat, hranila) na učinkovitost proizvodnje N₂O
- primerjati produktivnost bakterije *Vibrio sp.* DSM14379 z njenimi najbližjimi sorodniki (*Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581), ter pravim denitrifikatorjem (*Pseudomonas stutzeri* JM300)

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

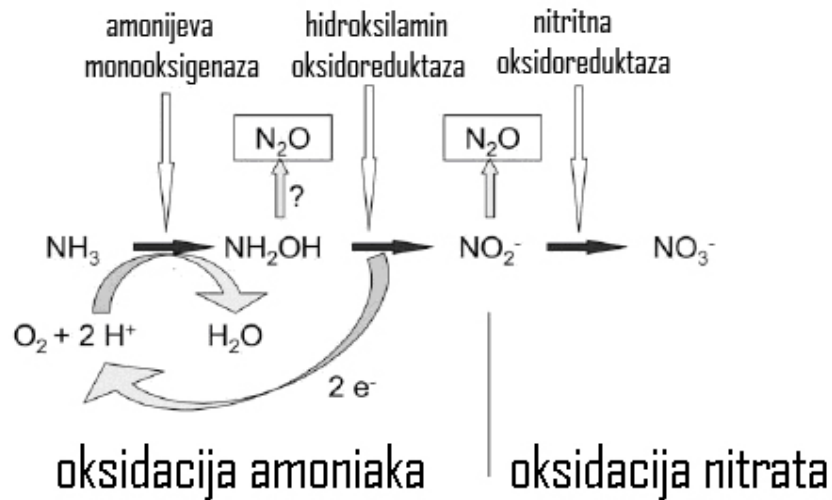
- Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja N₂O
- v primerjavi s svojimi bližnjimi sorodniki bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja več N₂O
- produkcija N₂O predstavlja za bakterijo *Vibrio sp.* alternativno metabolno pot, ki omogoča odstranjevanje viškov elektronov

2 PREGLED OBJAV

2.1 DIDUŠIKOV OKSID

Didušikov oksid (N₂O), znan tudi kot smejalni plin, je dolgoživ toplogredni plin v atmosferi z okrog 320 krat močnejšim 100 letnim potencialom globalnega segrevanja od ogljikovega dioksida (CO₂). Njegova življenjska doba v atmosferi je okrog 114 let (Forster in sod., 2007). N₂O prispeva okrog 5-6 % k skupnemu učinku tople grede (Radiative forc..., 1996), njegova troposferska koncentracija se je od razvoja industrije povzpela od 270 ppbv na okrog 319 ppbv (Forster in sod., 2007). Trenutno neravnovesje med viri in ponori N₂O je letno ocenjeno na +3,9 Tg/leto. Glavni razlogi za povečanje količin N₂O v atmosferi so raba mineralnih gnojil in sežiganje fosilnih goriv (Forster in sod., 2007). Glavni ponor N₂O v atmosferi so reakcije N₂O s kisikom (O₂) v stratosferi. Pri tem nastaja dušikov oksid (NO), ki reagira z ozonom v stratosferi in povzroča njegovo razgradnjo (Crutzen, 1970). Večina N₂O v atmosferi je biogenega izvora in ga bakterije proizvajajo v procesih nitrifikacije in denitrifikacije (Bouwman, 1995). Globalne emisije N₂O se po svetu še povečujejo, kar je povezano z večanjem svetovne populacije in s tem povezano potrebo po večji proizvodnji hrane (Kroeze, 1994). Glavni poti nastanka biogenega N₂O v vodnem okolju sta mikrobna avtotrofna nitrifikacija in respiratorna denitrifikacija (Bonin in sod., 2002).

2.2 NITRIFIKACIJA



Slika 1: Shematski prikaz poti avtotrofne nitrifikacije z encimi, ki jih vključuje (Hynes in Knowles, 1984; Poth in Focht, 1985; Wood, 1986).

Nitrifikacija je proces oksidacije amoniaka (NH₃) do nitrata (NO₃⁻) preko nitrita (NO₂⁻) (Slika 1). Te reakcije izvajata dve skupini mikroorganizmov. Prva skupina je sestavljena iz t.i. nitritatorjev oziroma primarnih nitrifikatorjev, ki pripeljejo reakcijo do NO₂⁻. Druga skupina imenovana sekundarni nitrifikatorji ali tudi nitratatorji izvede drugi korak do NO₃⁻ (Bock in sod., 1986). Med procesom nitrifikacije nastajajo nekateri intermediati. Prvi od teh je hidroksilamin (NH₂OH) katerega produkcijo katalizira amonijeva monooksigenaza, naslednji korak je oksidacija NH₂OH do NO₂⁻. Zadnjo reakcijo katalizira hidroksilamin oksidoreduktaza. NO₂⁻, ki pri tem nastane v naslednji stopnji, oksidirajo nitratatorji do NO₃⁻. Encim, ki katalizira to reakcijo, je nitritna oksidaza. Bakterije, ki izvajajo te procese, so vključene v rod *Nitrobacteriaceae* (Buchman, 1917). To so aerobni mikroorganizmi, mnogi od njih so tudi obligatni avtotrofi. Ker NH₃ in NO₂⁻ nista učinkovita vira energije, mora za redukcijo NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) mikroorganizem uporabiti reverzni tok elektronov. Zaradi tega nitrifikatorji rastejo počasi. Za prirast 1 g biomase

najbolje preučena nitrifikatorja *Nitrosomonas europaea* je potrebno 30 g NH₃ (Schlegel, 1992). N₂O pri oksidaciji amoniaka izvira iz kemične razgradnje intermediatov med NH₄⁺ in NO₂⁻ ali iz nepopolne oksidacije NH₂OH ali NO₂⁻.

2.3 HETEROTROFNA NITRIFIKACIJA

Poleg avtotrofnih nitrifikatorjev poznamo tudi heterotrofne nitrifikatorje. Ti kot vir energije in ogljika uporabljajo organske molekule. Heterotrofni nitrifikatorji so pogostejši pri glivah kot pri bakterijah, vendar igrajo bakterije pomembno vlogo v tem procesu v nekaterih okoljih (predvsem kisljih tleh). Substrat, intermedianti in produkti avtotrofne in heterotrofne nitrifikacije so enaki, medtem ko so encimi, ki sodelujejo v obeh procesih, različni (Wrage in sod., 2001). Ker lahko ti organizmi oksidirajo ureo in amonjak do nitrata, avtorji domnevajo, da si na ta način v ugodnih pogojih za nitrifikacijo zagotovijo substrat za denitrifikacijo. Heterotrofni nitrifikatorji so namreč pogosto sposobni denitrifikacije v aerobnem okolju (Robertson in sod., 1989).

2.4 DENITRIFIKACIJA

Denitrifikacija je redukcija NO₃⁻ do N₂. Tudi ta proces poteka preko več intermediatov, ki se lahko sproščajo v okolje. Te reakcije izvajajo denitrifikatorji, ki so taksonomsko in biokemijsko zelo raznolike bakterije, ki vključujejo rodove *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Propionebacterium* in druge. Ti v prvi vrsti heterotrofni organizmi so fakultativni anaerobi, ki so sposobni izrabljati NO₃⁻ namesto kisika kot končni prejemnik elektronov pri respiraciji, kar jim omogoča, da preživijo v anaerobnem okolju ali okolju z malo kisika. Encimi, ki sodelujejo pri denitrifikaciji so nitratna reduktaza (NAR), nitritna reduktaza (NIR), NO₂ reduktaza (NOR) in reduktaza dušikovega oksidula (N₂OR) kar je prikazano tudi na sliki 2.



Slika 2: Potek denitrifikacije in encimi, ki pri procesu sodelujejo (Hochstein in Tomlinson, 1988).

V nasprotju z nitrifikacijo je N₂O običajen intermediat denitrifikacije, ki se v okolje sprošča v večjih količinah v okolju z nizkim pH (Knowles, 1982) in okolju s prisotnim kisikom (Knowles, 1982), ki inhibirata delovanje N₂O reduktaze. Prav tako povzroča prebitek NO₃⁻ v okolju sproščanje N₂O, saj je NO₃⁻ preferenčni prejemnik elektronov v anaerobiozi (Schlegel, 1992). Poleg teh dejavnikov zadnjo stopnjo denitrifikacije inhibirajo še acetilen, azid, cianid, nekateri pesticidi in žveplove spojine kot je prikazano v preglednici 1 (Knowles, 1982).

Preglednica 1: Nekateri inhibitorji denitrifikacije ter njihove količine v katerih so učinkoviti in reakcija, ki jo inhibirajo (Knowles, 1982).

VRSTA INHIBITORJA	KONCENTRACIJA	INHIBIRANA REAKCIJA
acetilen	10 ⁻³ atm	N ₂ O → N ₂
azid, cianid, DNP (2,4 dinitrofenol)	10 ⁻⁴ M	NO ₃ ⁻ → N ₂ , N ₂ O → N ₂
nitrapirin (nitrifikacijski inhibitor)	14 ppm v tleh	NO ₃ ⁻ → N ₂
	50 ppm v tleh	ni učinka
	50 ppm v kulturi	NO ₃ ⁻ → N ₂
	20 ppm v obogateni kulturi	NO ₃ ⁻ → N ₂ O in N ₂
pesticidi:		
Vapam	20 ppm v tleh	NO ₃ ⁻ → N ₂
Dalapon	10 ppm v tleh	NO ₃ ⁻ → N ₂
Toluidni derivati		NO ₂ ⁻ , N ₂ O → N ₂
žveplove spojine:		
SO ₄ ²⁻	100-500 μg S g ⁻¹	NO ₃ ⁻ izgine iz tal
S ²⁻	40 mmol g ⁻¹	NO ₃ ⁻ → plinasti produkti
S ²⁻	0,3 mM	NO → N ₂ O
S ²⁻	0,3 mM, 8 μmol g ⁻¹	N ₂ O → N ₂

Acetilen (C₂H₂) je znan kot zelo učinkovit inhibitor redukcije N₂O do N₂, zato se ga v številnih študijah denitrifikatorjev uporablja za blokiranje zadnjega koraka denitrifikacije, kar vodi do kopičenja in sproščanja N₂O (Yoshinari in sod., 1977; Murray in Knowles, 2003). Hitrost in produkte denitrifikacije v naravi regulirajo predvsem trije okoljski dejavniki: anoksičnost, prisotnost končnega prejemnika elektronov za denitrifikacijo in prisotnost vira ogljika.

Mahne in Tiedje (1995) sta opisala dva glavna kriterija, ki morata biti izpolnjena, da lahko nek organizem uvrstimo med respiratorne denitrifikatorje. To sta, da proizvajajo N₂O iz nitrata ali nitrita in da je redukcija nitrata ali nitrita sklopljena s prirastjo biomase. Te svoje trditve sta tudi preverila na več splošno znanih denitrifikatorjih in drugih mikroorganizmih pri katerih denitrifikacijska sposobnost ni bila tako dobro določena. Ugotovila sta, da je pri respiratornih denitrifikatorjih razmerje med prirastjo biomase in začetno koncentracijo NO₃⁻ ali NO₂⁻ linearno, razen pri organizmih za katere je NO₂⁻ toksičen. Pri identifikaciji denitrifikatorja se kot hitri test najpogosteje uporablja test odstranjevanja nitrata iz medija, vendar organizmi, ki odstranjujejo nitrat iz medija niso nujno denitrifikatorji, saj je lahko disimilativna nitratna redukcija prav tako vzrok za porabo nitrata ali nitrita iz medija. Tudi drugi najpogostejši testi za določanje denitrifikatorjev t.i. tvorba plina v Durhamovih cevkah, zvišanje pH v mediju in produkcija N₂O niso vedno specifični za respiratorne denitrifikatorje. Največkrat prave denitrifikatorje (respiratorne denitrifikatorje) zamenjamo za nitratne respiratorje (npr. bakterija *E. coli*), ki so sposobni le prvega koraka denitrifikacije in ne proizvajajo dušikovih plinastih produktov, prav tako pri njih ni linearnega razmerja med prirastjo biomase in začetno koncentracijo nitrata ali nitrita, prirast biomase je pri nitratnih respiratorjih nižja na količino porabljenega nitrata (Mahne in Tiedje, 1995).

Denitrifikatorji so taksonomsko in biokemijsko zelo raznolika skupina bakterij, ki jih zato lahko delimo v več podskupin katerim je skupno, da so sposobni izrabljati NO₃⁻ kot končni prejemnik elektronov namesto kisika (Knowles, 1982). Večinoma gre za heterotrofne bakterije, od katerih lahko nekatere rastejo na spojinah z enim ogljikovim atomom. Druga skupina raste avtotrofno na H₂, CO₂ ali reduciranih žveplovih spojinah. Ena od skupin je sposobna fotosinteze. Večina denitrifikacijskih bakterij lahko tvori vse reduktaze za

redukcijo nitrata do N₂. Nekaterim manjka zapis za katero od reduktaz npr. NO₃⁻ reduktazo ali N₂O reduktazo, zato je pri teh bakterijah NO₃⁻ ali N₂O končni prejemnik elektronov. Drugi kriterij po katerem lahko ločimo denitrifikatorje je energijska učinkovitost. Glede na ta kriterij lahko respiratorne denitrifikatorje razdelimo v tri skupine. Prvo skupino imenovano tudi pravi denitrifikatorji, ki tvorijo ≥ 4,5 g proteina na mol elektronov. V to skupino sodijo bakterije *Flavobacterium sp.*, *Alcaligenes sp.* in *Achromobacter cycoclastes* (Mahne in Tiedje, 1995). Večina splošno poznanih denitrifikatorjev vključno s *Pseudomonas stutzeri JM 300* spada po učinkovitosti izrabe nitrata v drugo od treh skupin, ki tvorijo 2,5- 4 g biomase na mol elektronov. Tretja skupina vključuje predstavnike, ki tvorijo manj kot 2 g biomase na mol porabljenih elektronov. Predstavniki zadnje skupine rastejo počasneje, zato je težje določiti, da gre za respiratorne denitrifikatorje. Naslednji kriterij je tvorba N₂O ali N₂ kot posledica redukcije nitrata. Avtorja sta ugotovila, da je bila vsota proizvedenega N₂O in N₂ pri vseh denitrifikacijskih sevih višja od 80 % celotno reduciranega dušika. Pri nitratnih respiratorjih je bila pretvorba nitrata in nitrita do plinastih produktov manj učinkovita in je znašala precej manj kot 50 %.

Bleakley in Tiedje (1982) sta preučevala produkcijo N₂O pri organizmih, ki niso nitrifikatorji in denitrifikatorji. Kot možne producente N₂O sta preiskovala različne heterotrofne bakterije in glive. Ugotovila sta, da proizvajajo N₂O vsi nitratni respiratorji. Poleg tega sta Smith in Zimmerman (1981) preverila 214 najpogostejših vrst nitratnih reducentov v tleh in ugotovila, da kar 98 % teh vrst proizvaja N₂O. Tudi Bleakely in Tiedje (1982) sta kot producente N₂O preverila predstavnike večine rodov nitratnih respiratorjev in ugotovila, da prav vsi preučevani organizmi proizvajajo N₂O. Ugotovila sta tudi, da večanje koncentracije glukoze v gojišču negativno vpliva na produkcijo N₂O. Eksperimenti z dvema enterobakterijama (*E. coli* in *Serratia sp.*) so pokazali, da sta ta dva mikroorganizma začela proizvajati N₂O šele po prehodu v stacionarno fazo rasti in sta nato konstantno producirala N₂O nadaljnjih 36 ur. Do podobnih zaključkov sta prišla tudi Smith in Zimmerman (1981) pri bakterijah *Bacillus* in *Citrobacter*. Medtem ko začnejo nitratni respiratorji proizvajati N₂O nekaj ur po začetku inkubacije v anaerobnih pogojih, asimilativni nitratni reducenti s tem postopkom začnejo šele po nekaj dneh, ko se rast ustavi. Prav tako asimilativni nitratni reducenti proizvajajo manjše količine N₂O od respiratorjev. Avtorja je zanimalo tudi, kakšen je mehanizem produkcije N₂O pri nitratnih

respiratorjih in reducentih. Domnevala sta, da nastali N₂O pri asimilativnih nitratnih reducentih izvira bodisi iz reakcije med NH₂OH in NO₂⁻, ki producira N₂O ali iz nepopolne asimilatorne nitritne redukcije, ko je bil donor elektronov limitni faktor. Ker se produkcija nitrata tako pri nitratnih respiratorjih kot reducentih pojavi šele v stacionarni fazi rasti, sta avtorja domnevala, da je za produkcijo odgovoren eden od encimov sekundarnega metabolizma. Pri vprašanju pomembnosti tega procesa sta zaključila, da večina nitratnih reducentov v tleh proizvaja N₂O, prav tako so ti nitratni reducenti bolj številni od pravih nitrifikatorjev in denitrifikatorjev. Vseeno sta zaradi nizke prisotnosti nitrata in nizke kompetitivnosti zanj predpostavljala, da ta način proizvodnje N₂O v tleh nima večje veljave.

2.5 OCEANI KOT VIRI N₂O

Oceani in morja so pomemben naravni vir N₂O, ki vsako leto prispevajo okrog 4 Tg, od tega iz obalnih voda in estuarjev, ki zavzemajo le 20 % morske površine izvira kar 50 % morskega N₂O. Zaradi povečanja organskega onesnaženja priobalnih voda, se bodo po nekaterih predvidevanjih v naslednjih 50 letih emisije N₂O iz priobalnih voda podvojile (Seitzinger in Kroeze, 1998).

2.6 BAKTERIJA *Vibrio sp.* DSM14379, NJENI SORODNIKI IN BAKTERIJA *Pseudomonas stutzeri* JM300

2.6.1 Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379

Bakterijo *Vibrio sp.* DSM14379 so izolirali iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka v Tržaškem zalivu (Stopar in sod., 2004). V gojišču PKS ta bakterija raste do vključno 17 % (w/V) NaCl, optimum rasti doseže pri 3 % (w/V) in ne raste brez soli (Danevčič, 2006). Na podlagi morfoloških in biokemijskih lastnosti je bil bakterijski izolat uvrščen v rod *Vibrio*, kar je bilo potrjeno z analizo maščobnokislinskih profilov in 16s rRNA podobnosti. Fiziološki podatki so se razlikovali od vseh že opisanih vrst rodu *Vibrio*, ki so bile do takrat deponirane v mikrobioloških zbirkah, zato so nov izolat označili kot *Vibrio sp.*

DSM14379 (Gnezda-Meijer in sod., 2005). Kasneje so na podlagi analize DNA ugotovili, da ta mikroorganizem izkazuje največjo podobnost DNA z že prej izolirano in opisano vrsto *Vibrio ruber* in da gre verjetno za njegovo podvrsto. Izolirani sev kaže sorodnost tudi z *Vibrio gazogenes* in *Vibrio rhizosphaerae*.

2.6.2 Bakterija *Vibrio ruber*

Morska bakterija *Vibrio ruber* VR1^T je fakultativno anaerobna bakterija prvič izolirana iz plitvih priobalnih voda v regiji Keelung, Tajvan (Sheih in sod., 2003). Bakterija tvori rdeče obarvane kolonije in je halofilna, saj ne raste na gojišču brez soli. Optimum rasti doseže pri gojenju okrog 2 % NaCl. Tipski sev vrste je sev VR1^T in je po fenotipskih lastnostih zelo podoben bakteriji *Vibrio gazogenes* od katere se med drugim razlikuje po sposobnosti redukcije nitrata do nitrita.

2.6.3 Bakterija *Vibrio gazogenes*

Bakterija *Vibrio gazogenes* je halofilna bakterija iz rodu *Vibrio*, ki podobno kot *Vibrio ruber* pri rasti tvori značilne rdeče obarvane kolonije. Bakterijo so prvič izolirali iz slanih močvirij v Massachusettsu, ZDA in jo takrat imenovali *Beneckea gazogenes* (Harwood in sod., 1978). Šele ko je bil rod *Beneckea* ukinjen, so bakterijo uvrstili v rod *Vibrio*. Za bakterijo je značilno, da ne pretvarja nitrata v nitrit in da podobno kot njeni sorodniki izolirani iz morskih okolij bolje raste v mediju z dodano soljo.

2.6.4 Bakterija *Vibrio rhizosphaerae*

Bakterija *Vibrio rhizosphaerae* je še en bližnji sorodnik bakterije *Vibrio ruber*, ki so jo izolirali iz rizosfere riža, ki raste v povezavi z mangrovami v regiji Pichavaram, Indija (Kumar in Nair, 2007). Kot ostale sorodne vrste tudi ta bolje raste v mediju z dodano soljo z optimumom okrog 2 %. Za to bakterijo je ravno tako značilna tvorba rdečega barvila. Bakterija se od *Vibrio ruber*, loči po tem, da ni zmožna redukcije nitrata do nitrita, zato smo to bakterijo v poskusih uporabili kot znanega sorodnega neproducenta N₂O.

2.6.5 Bakterija *Pseudomonas stutzeri* JM300

Bakterija *Pseudomonas stutzeri* JM300 je naravni sev izoliran iz tal. Gre za tipičnega predstavnika denitrifikatorjev katerega denitrifikacijske sposobnosti in encimi so dobro opisani. Poleg tega jo je preprosto gojiti, zato se v številnih raziskavah denitrifikacije uporablja kot modelni organizem. Pri študijah tega organizma so med drugim ugotovili, da med procesom denitrifikacije ne proizvajajo zunajceličnega N₂O, ampak v okolje izloča samo N₂ (Carlson in Ingraham, 1982). Če v gojišče dodamo močan inhibitor zadnjega koraka denitrifikacije (redukcija N₂O → N₂), kar lahko dosežemo z dodatkom acetilena v atmosfero, se ves nitrat pretvori v N₂O, ki ga lahko merimo (Yoshinari in sod., 1977).

2.6.6 Metabolizem nitrata in proizvodnja N₂O znotraj rodu *Vibrio*

Denitrifikatorji oziroma nitrati respiratorji iz rodu *Vibrio* so zelo redki. Ena od bakterij, ki je bila nekdanj uvrščena v rod *Vibrio*, je *Vibrio succinogenes*, ki se sedaj imenuje *Wolinella succinogenes*. Bakterija je nitraten respirator, ki ni denitrifikator, in je prvi sev pri katerem so dokazali, da lahko raste na N₂O. *Wolinella* je sposobna oksidirati format z redukcijo nitrata do nitrita, nitrita do amonija in N₂O do N₂. Velika večina bakterij iz rodu *Vibrio* je sposobna pretvarjati nitrat v nitrit. Redki izjemi sta *Vibrio gazogenes* (Farmer in sod., 1988) in *Vibrio rhizosphaerae* (Kumar in Nair, 2007). Senga in sod. (2006) so preučevali produkcijo in akumulacijo N₂O v priobalnem sedimentu slanih jezer Shinji in Nakaurni. Kot halofilna producenta N₂O so izolirali dve bakterijski vrsti in eno od njih identificirali kot vrsto iz rodu *Vibrio*, vendar natančnejša identifikacija ni podana. Gre za neobarvan izolat iz rodu *Vibrio*, kar lahko nakazuje, da ne gre za ožjega sorodnika bakterije *Vibrio ruber*. Prav tako je iz študije možno razbrati, da gre za prvega denitrifikatorja iz rodu *Vibrio*, ki je sposoben nitrat reducirati do N₂. Avtorji so v študiji proučevali vpliv H₂S na akumulacijo. Akumulacija N₂O se je povečala, saj H₂S inhibira redukcijo N₂O do N₂. Povečanje akumulacije je bilo najbolj opazno pri začetni koncentraciji H₂S 0-10 mgS L⁻¹, medtem ko je z večanjem koncentracije H₂S nad to mejo vpliv padal. Avtorji so razlago za to iskali v dejstvu, da H₂S do neke mere inhibira delovanje N₂O reduktaze. Ko vrednosti

H₂S presežejo neko kritično mejo, se celoten proces denitrifikacije ustavi zaradi same toksičnosti H₂S.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

- acetilen C₂H₄ (Messer, Slovenija)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- amonijev klorid NH₄Cl M_w= 53,49 g/mol (Merck, Nemčija)
- Bradfordov reagent (Sigma, ZDA)
- D-(+)-glukoza C₆H₁₂O₆ (Kemika, Hrvaška)
- destilirana voda
- dinatrijev hidrogen fosfat Na₂HPO₄ M_w= 141,96 g/mol (Merck, Nemčija)
- dušik N₂ (Messer, Slovenija)
- dušikov oksidul N₂O (Messer, Slovenija)
- goveji serumski albumin (BSA) (Fluka, Švica)
- kalcijev klorid dihidrat CaCl₂·2H₂O M_w= 147,02 g/mol (Zorka Šabac, Srbija)
- kalijev dihidrogen fosfat KH₂PO₄ M_w=136,09g/mol (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrat (Biolife, Italija)
- magnezijev klorid heksahidrat MgCl₂·6H₂O M_w=203,3 g/mol (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat MgSO₄·7H₂O M_w=246,48 g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid NaOH M_w=40,00g/mol (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid NaCl M_w=58,5 g/mol (Merck, Namčija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- tripton (Biolife, Italija)

3.1.2 Gojišča

- Gojišče PKS (pepton-kvasni ekstrakt-sol):
 - 5 g peptokompleks
 - 1 g kvasni ekstrakt
 - 2 g MgCl₂·6H₂O
 - 30 g (3 % (w/V) PKS) NaCl
 - 1000 ml destilirane vode

- Gojišče M9 za *Vibrio*:
 - 200 ml 5xM9 soli (64 g Na₂HPO₄·2H₂O, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄CL, 150g NaCl ter 1000 ml destilirane vode)
 - 2 mL 1M MgSO₄·7H₂O
 - 0,1 mL 1M CaCl·2H₂O
 - založna raztopina 500 g L⁻¹ glukoze
 - 800 ml destilirane vode

(da smo dosegli ustrezno koncentracijo glukoze v gojišču (0,05, 0,25, 0,5, 1 % w/V) smo v gojišče dodali 1, 5, 10 ali 20 ml založne raztopine glukoze na 1000 ml gojišča)

- Gojišče PKE:
 - 6 g peptokompleks
 - 3 g kvasni ekstrakt
 - 1000 ml destilirane vode

- Gojišče M9 za *E.coli*:
 - 200 ml 5xM9 soli (64 g Na₂HPO₄·2H₂O, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄CL, 2,5 g NaCl, 1000 ml destilirane vode).
 - 2 mL 1M MgSO₄·7H₂O
 - 0,1 mL 1M CaCl·2H₂O
 - založna raztopina 500 g L⁻¹ glukoze
 - 800 ml destilirane vode

(da smo dosegli ustrezno koncentracijo glukoze v gojišču (0,05, 0,25, 0,5, 1 % w/V) smo v gojišče dodali 1, 5, 10 ali 20 ml založne raztopine glukoze na 1000 ml gojišča)

Za trdna gojišča smo dodali 15 g agar-agar na 1000 mL tekočega gojišča.

3.1.3 Bakterijski sevi

- *Vibrio sp.* DSM14379
- *Vibrio gazogenes* DSM21264
- *Vibrio ruber* DSM16370
- *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581
- *Pseudomonas stutzeri* JM300

3.2 GOJENJE BAKTERIJSKIH KULTUR

Za proučevanje produkcije N₂O smo uporabili bakterijske izolate *Vibrio sp.* DSM14379, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581. Bakterijske kulture vibrijev smo ohranjali viabilne tako, da smo jih enkrat tedensko precepili na sveže trdno gojišče PKS, jih inkubirali pri 28 °C za 24 ur in jih potem hranili pri 4 °C. Za eksperimente smo bakterijsko kulturo najprej nacepili iz trdnega gojišča PKS v 10 ml tekočega gojišča PKS s 3 % (w/V) NaCl oziroma M9 z ustrežno koncentracijo glukoze (0,05 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % w/V) v gojišču. Po inokulaciji smo kulturo gojili 8 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Nato smo kulturo v eksponentni fazi rasti precepili (1 % V/V inokulum) v 100 ml svežega gojišča v 250 ml erlenmajerice. Bakterijsko kulturo smo gojili na stresalniku pri 28 °C preko noči. Prekonočno kulturo smo nato precepili v pripravljeno gojišče v Hungatovih epruvetah, tako da smo 9 ml gojišča (PKS oziroma M9 z ustrežno koncentracijo glukoze) dodali 1 ml prekonočne kulture (10 % V/V inokulum). Pred inkubacijo smo v vseh epruvetah tri krat izmenjali atmosfero z N₂, tako da smo zagotovili anaerobno okolje. V epruvete smo z injekcijsko brizgo dodali ustrežno količino 20 % (w/V) založne raztopine KNO₃, da smo dosegli ustrežno koncentracijo KNO₃ v gojišču (0, 0,1 0,5 in 1 % KNO₃ (w/V)). Po nacepljanju smo z injekcijsko brizgo dodali acetilen tako, da je koncentracija acetilena v epruveti znašala 10 % (V/V). V kontrolne epruvete acetilena nismo dodali v plinsko fazo. Kulturo smo v Hungatovih epruvetah pustili rasti 24 ur pri 28 °C ter po tem času izmerili OD₆₅₀, količino proteina in vsebnost N₂O v plinski fazi. Delali smo v 4 ponovitvah.

Za študij produkcije N₂O smo uporabili tudi bakterijo *Pseudomonas stutzeri* JM300 katere gojenje se je od gojenja vibrijev razlikovalo po tem, da smo jo gojili v gojišču M9 za *E. coli* z ustrežno koncentracijo glukoze oziroma gojišču PKE.

3.2.1 Spremljanje vpliva koncentracije glukoze

Bakterijske seve *Vibrio sp.* DSM14379, *Vibrio gazogenes* DSM21264 in *Pseudomonas stutzeri* JM300 smo najprej gojili aerobno v manjših 50 ml erlenmajericah z 10 ml gojišča, ki smo ga inokulirali z ezo iz trdnega gojišča. Po nacepiti smo kulturo gojili 8 ur na stresalniku (Vibromix 40, Tehtnica, Slovenija) pri 200 obratih na minuto pri 28 °C. Nato smo kulturo v eksponentni fazi rasti precepili (1 % V/V inokulum) v 100 ml svežega gojišča v 250 ml erlenmajerici. Bakterijsko kulturo smo gojili na stresalniku pri 28 °C preko noči. Prekonočno kulturo smo potem precepili v pripravljeno gojišče v Hungatovih epruveh, tako da smo 9 ml gojišča (PKS oziroma M9 z ustrežno koncentracijo glukoze (0,05, 0,25, 0,5 in 1 % w/V) dodali 1 ml prekonočne kulture (10 % V/V inokulum). Kulturo smo v Hungatovih epruveh gojili 24 ur pri 28 °C brez stresa in po tem času izvedli meritve.

3.2.2 Spremljanje vpliva dodanega KNO₃

Vpliv dodanega nitrata na produkcijo N₂O smo ugotavljali pri bakterijah *Vibrio sp.* DSM14379 in *Pseudomonas stutzeri* JM300, ki smo ju gojili v Hungatovih epruveh v gojišču PKS oziroma PKE z dodanim 0,1 0,5 in 1 % KNO₃ (w/V) ter na minimalnem gojišču M9 za *Vibrio* oziroma M9 za *E. coli*, kjer smo preverjali produkcijo N₂O z in brez dodatka nitrata (0 ali 0,5 % KNO₃ (w/V)).

3.2.3 Spremljanje vpliva dodatka acetilena

Vse mikroorganizme smo v Hungatovih epruveh gojili kot je opisano zgoraj z ali brez dodatka 10 % acetilena (V/V) v plinski fazi.

3.2.4 Merjenje OD₆₅₀

Pri vseh vzorcih smo merili OD₆₅₀ tako da smo v času T₀ in T₂₄ kulturo v Hungatovih epruveh premešali na vibracijskem mešalniku in nato z injekcijsko brizgo odvzeli 300 µL kulture ter jo prenesli v mikrotitrsko ploščo. Meritev OD₆₅₀ smo izvedli na optičnem čitalcu (Multiskan Spectrum, THERMO, Finska).

3.2.5 Merjenje količine nastalega N₂O

Količino nastalega N₂O v Hungatovih epruveh smo merili s pomočjo plinskega kromatografa (Network GC system, 6890 N, Agilent technologies). Plinski kromatograf je bil sestavljen iz kapilarne kolone (GS-CarbonPLOT, 30 m x 0.53 mm ID x 3 µm film (Agilent Technologies, USA)), metanizatorja, detektorja na plamensko celico (FID - flame ionization detector) in detektorja na zajem elektronov (µECD - electron capture detector). Nosilni plin skozi kolono je bil N₂ s pretokom 5,6 mL min⁻¹. Temperature injektorja, pečice, metanizatorja, FID in µECD so bile 100, 50, 375, 300 °C in 300 °C. S pomočjo površine kromatografskega vrha za znano koncentracijo N₂O smo določili koncentracijo N₂O v naših vzorcih (ppm). Za umerjanje plinskega kromatografa smo uporabili standardno plinsko mešanico z 10 ppm N₂O. Kontrolno meritev smo opravili petkrat in potem iz povprečja površin kromatografskih vrhov vseh petih meritev določil povprečno vrednost s pomočjo katere smo določali koncentracijo N₂O v vzorcih.

3.2.6 Vrednotenje biomase

Po končnem merjenju proizvedenega N₂O s plinskim kromatografom, smo eno ponovitev vsake serije vzorcev razdrli in vzeli 5 ml kulture, ki smo jo prenesli v sterilno 15ml centrifugirko. Celično kulturo smo centrifugirali 10 min pri 10000 obratih na minuto pri 4 °C (Laboratory centrifuges Sigma 3K30, Nemčija). Supernatant smo odlili in celični pelet resuspendirali v 5 ml fiziološke raztopine. Centrifugiranje smo ponovili in ponovno odlili supernatant. Nato smo celice resuspendirali v 1 ml fiziološke raztopine. Bakterijsko biomaso smo za tem prenesli v 2 ml sterilne mikrocentrifugirke, v katerih smo celice

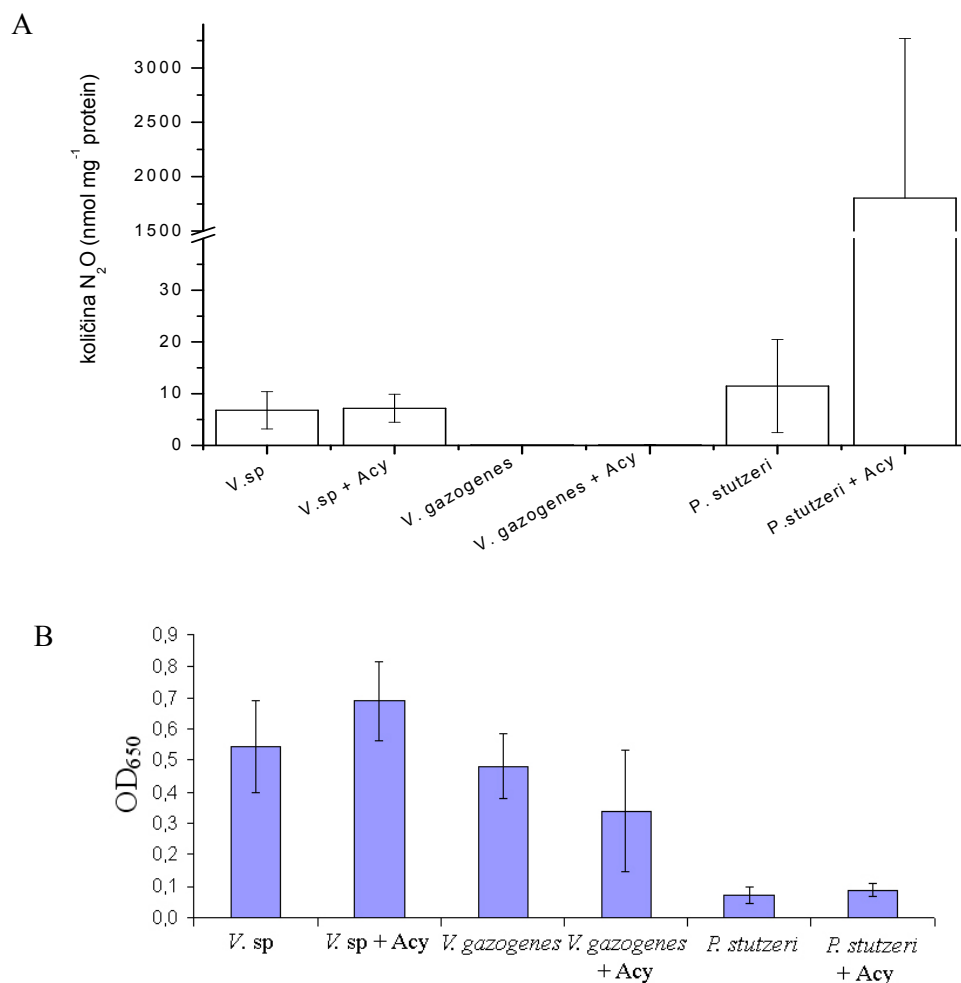
razbili s soniciranjem (šestkrat 30 sekund z amplitudo ultrazvoka 6 μ m) (MSE 150W Ultrasonic Disintegrator Mk2, Velika Britanija). Sonicirano biomaso smo shranili pri -18 °C in jo potem v naslednjih nekaj dneh (1-4 dni) uporabili za merjenje koncentracije proteinov v vzorcu.

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo merili z Bradfordovim reagentom po postopku, ki vključuje uporabo mikrotitrne ploščice s 96 luknjicami. V 2 ml sterilnih mikrocentrifugirkah smo pripravili redčitveno vrsto standarda BSA s koncentracijo med 0-1,4 mg/ml (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4 mg ml⁻¹). Redčitve v mikrocentrifugirkah smo potem premešali na vibracijskem mešalniku in v posamezne luknjice na mikrotitrski plošči prenesli po 5 μ l standarda ali sonicirane biomase. Potem smo dodali 250 μ l Bradfordovega reagenta in mikrotitrsko ploščico dali na vibracijski mešalnik ter pazljivo premešali. Po približno 5 min smo izmerili absorbanco pri 595 nm z optičnim čitalcem (Muliskan Spectrum, THERMO, Finska). Koncentracijo proteinov v vzorcu smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje pridobljene s standardom BSA.

4 REZULTATI

4.1 PRODUKCIJA N₂O PRI BAKTERIJAH *Vibrio sp.*, *Vibrio gazogenes* IN *Pseudomonas stutzeri* JM300

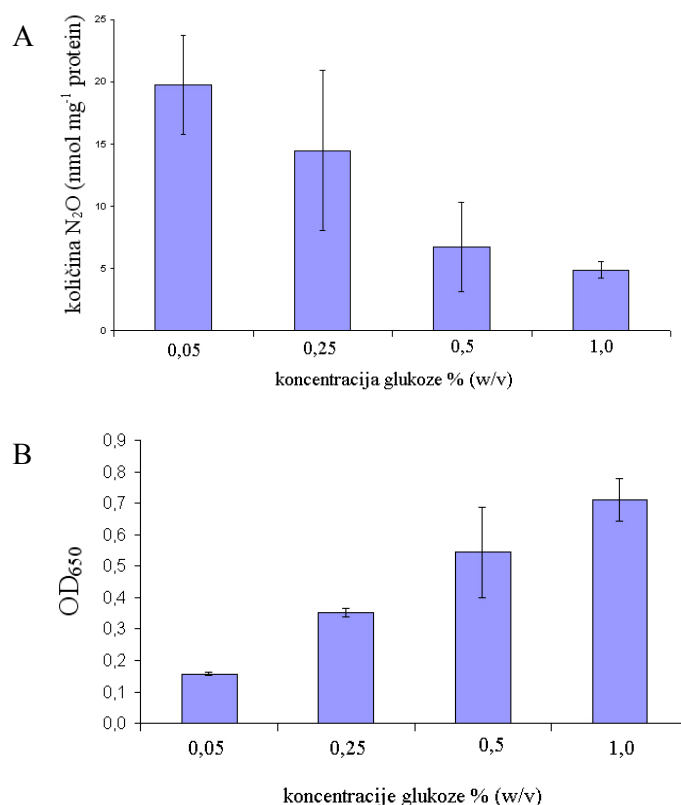
Bakteriji *Vibrio sp.* in *Vibrio gazogenes* smo gojili na minimalnem gojišču M9 za *Vibrio*. Ker *Pseudomonas stutzeri* JM 300 v takem gojišču ni zrasel smo ga gojili v gojišču M9 za *E. coli*, ki vsebuje nižjo koncentracijo NaCl. Bakterijo *Pseudomonas stutzeri* smo uporabili kot predstavnika pravih denitrifikatorjev. Na sliki 3A je primerjava produkcije N₂O posameznih bakterij in vpliv acetilena na produktivnost. Oba predstavnika rodu *Vibrio* sta v minimalnem gojišču rasla boljše od bakterije *Pseudomonas stutzeri* JM 300, kot je razvidno iz slike 3B, saj smo pri teh dveh organizmih izmerili vsaj štirikrat višjo vrednost OD₆₅₀. Bakterija *Vibrio gazogenes* ne proizvaja N₂O. Dodatek acetilena nima zaznavnega vpliva na produkcijo N₂O pri obeh predstavnikih iz rodu *Vibrio*. Nasprotno ima dodatek acetilena izrazit vpliv na bakterijo *Pseudomonas stutzeri* JM300, kjer se je količina proizvedenega N₂O v prisotnosti acetilena povečala približno 1300 krat.



Slika 3: (A) Primerjava produkcije N₂O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD₆₅₀) pri bakterijah *Vibrio sp.*, *Vibrio gazogenes* in *Pseudomonas stutzeri* na minimalnem gojišču (M9 za *Vibrio* oz. M9 za *E. coli* pri bakteriji *Pseudomonas stutzeri*) z 0,5 % (w/V) glukoze in 0,5 % (w/V) KNO₃ z dodanim 10 % (V/V) ali brez dodanega acetilena (Acy) po 24 urah rasti pri 28 °C.

4.2 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ GLUKOZE V MINIMALNEM GOJIŠČU NA PRODUKCIJO N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.*

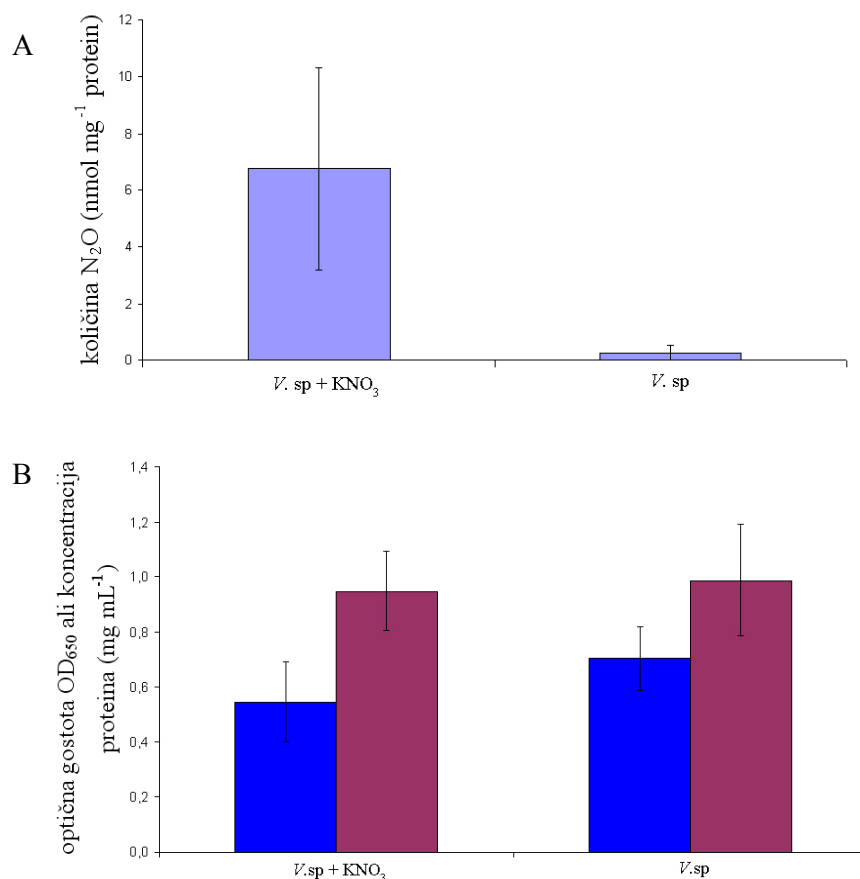
Vpliv različnih koncentracij glukoze na produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* je prikazan na sliki 4A. Bakterije smo gojili v minimalnem gojišču M9 za *Vibrio* z dodatkom 0,5 % KNO₃ in ustrezno koncentracijo glukoze, z ali brez dodatka acetilena. Ker vpliva acetilena na produkcijo N₂O nismo zaznali, smo na sliki 4A prikazali samo vzorce brez dodatka acetilena. Slika 4B kaže, da se z višanjem koncentracije glukoze povečuje prirast biomase merjene z OD₆₅₀. Izmerjen OD₆₅₀ je bil pri najvišji koncentraciji glukoze okrog štirikrat večji od izmerjene vrednosti pri najmanjši koncentraciji glukoze. Na sliki 4A vidimo, da se učinkovitost produkcije N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* zmanjšuje z večanjem koncentracije glukoze v gojišču. Tako je bila učinkovitost produkcije N₂O pri 0,05 % glukoze v gojišču do štirikrat večja od produkcije N₂O pri 1 % glukoze v gojišču. Učinek višje koncentracije glukoze na prirast biomase je obraten od učinka na produkcijo N₂O.



Slika 4: (A) Primerjava produkcije N₂O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD₆₅₀) v odvisnosti od začetne koncentracije glukoze pri *Vibrio sp.* na minimalnem gojišču M9 z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO₃ po 24 urah rasti pri 28 °C.

4.3 VPLIV DODATKA KNO₃ NA PRODUKCIJO N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.* V MINIMALNEM GOJIŠČU

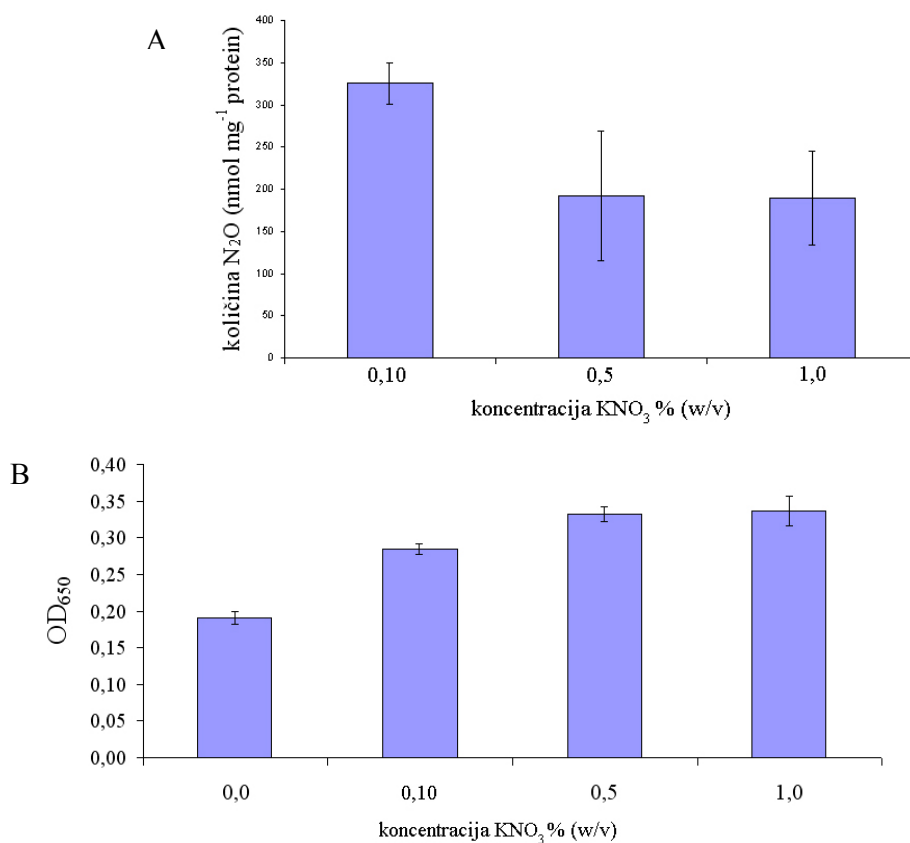
Bakterije smo gojili v minimalnem gojišču M9 za *Vibrio* z dodatkom 0,5 % glukoze (w/v) z ali brez dodatka nitrata. Bakterije smo gojili z ali brez acetilena, vendar vpliva acetilena nismo zaznali, zato smo na sliki 5A prikazali samo vzorce gojene brez dodatka acetilena. Na sliki 5A vidimo vpliv dodatka nitrata na produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* Iz slike 5A je razvidno, da bakterija brez dodatka nitrata tvori zelo malo ali nič N₂O, medtem ko je ob dodatku nitrata proizvodnja znatno večja. Na sliki 5B vidimo, da dodatek nitrata v gojišče nima pomembnega vpliva na OD₆₅₀ *Vibrio sp.* in s tem povezano prirast biomase v minimalnem gojišču.



Slika 5: (A) Vpliv dodatka KNO₃ na produkcijo N₂O in (B) vpliv dodatka KNO₃ na optično gostoto pri 650 nm (OD₆₅₀) (modra stolpca) in koncentracijo proteina (bordo stolpca) pri *Vibrio sp.* na minimalnem gojišču (M9) z 0,5 % (w/V) glukoze z ali brez dodanega 0,5 % (w/V) KNO₃ po 24 urah rasti pri 28 °C.

4.4 VPLIV KONCENTRACIJE DODANEGA NITRATA NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.* V BOGATEM GOJIŠČU

Bakterije smo gojili v bogatem gojišču PKS z dodatkom različnih koncentracij nitrata. Bakterije smo gojili z ali brez acetilena, vendar vpliva acetilena nismo zaznali, zato smo na sliki 6A prikazali samo vzorce gojene brez dodatka acetilena. Na sliki 6A vidimo vpliv dodatka različnih koncentracij nitrata na produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* Z višanjem koncentracije nitrata količina N₂O pada, medtem ko je brez dodatka nitrata produkcija neznatna (podatki niso prikazani). Opazili smo tudi, da je za razliko od minimalnega gojišča izmerjena koncentracija N₂O pri tem gojišču pri isti koncentraciji nitrata znatno višja. Kot je razvidno iz slike 6B ima dodatek nitrata pomemben vpliv na prirast biomase v bogatem gojišču, saj smo na ob gojenju z dodatkom nitrata izmerili do dvakrat višji OD₆₅₀ kot ob gojenju brez nitrata.

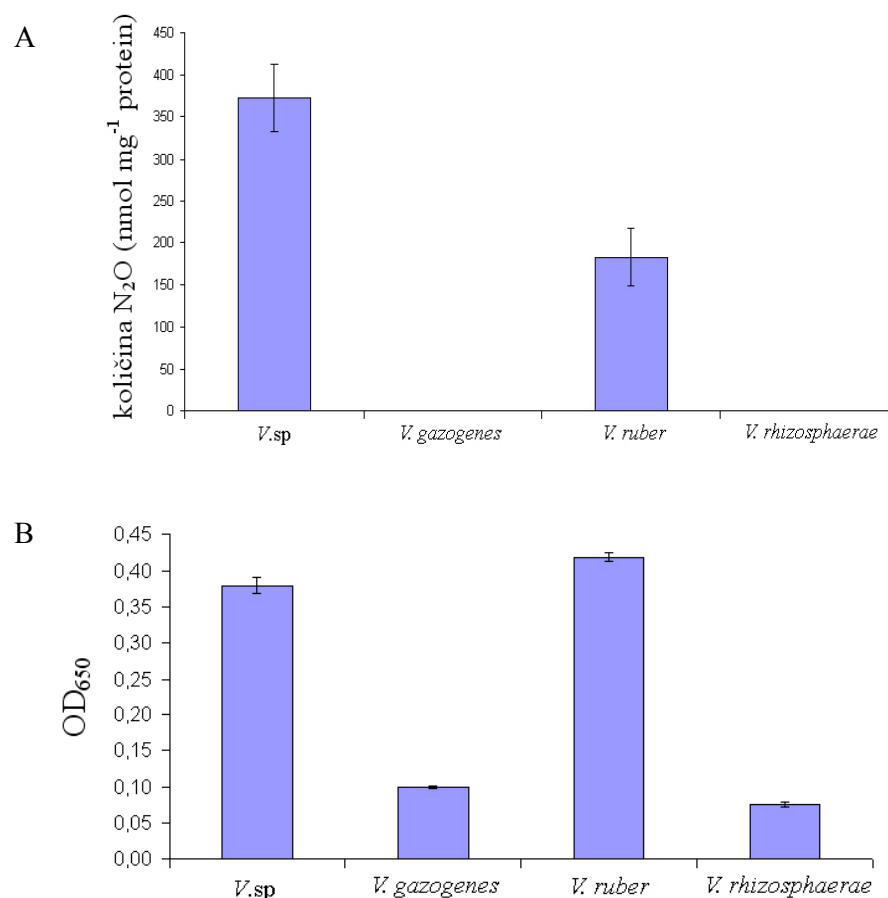


Slika 6: (A) Količina proizvedenega N₂O in (B) Optična gostota pri 650 nm (OD₆₅₀), v odvisnosti od koncentracije dodanega KNO₃ pri bakteriji *Vibrio sp.* v bogatem gojišču PKS po 24 urah rasti pri 28 °C.

4.5 PRIMERJAVA PRODUKCIJE N₂O BAKTERIJE *Vibrio sp.* IN NJENIH SORODNIKOV

V tej seriji poskusov smo preverjali učinkovitost produkcije N₂O bakterije *Vibrio sp.* in njenih sorodnikov *Vibrio ruber*, *Vibrio rhizosphaerae* in *Vibrio gazogenes*, ki smo jih gojili v bogatem gojišču PKS z dodatkom 0,5 % KNO₃. Bakterije smo gojili tudi z dodatkom acetilena. Ker vpliv acetilena ni bil zaznaven, smo na tej sliki prikazali samo meritve vzorcev brez acetilena. Na sliki 7A vidimo, da *Vibrio gazogenes* in *Vibrio rhizosphaerae* ne tvorita N₂O. Bakteriji *Vibrio sp.* in *Vibrio ruber* tvorita N₂O, vendar je bakterija *Vibrio sp.* pri tem približno dvakrat učinkovitejša.

Iz slike 7B lahko vidimo, da sta najbolje rasli obe bakteriji, ki lahko proizvajata N₂O, medtem ko smo pri obeh bakterijah, ki tega ne zmoreta izmerili tri do štirikrat nižji OD₆₅₀.



Slika 7: (A) Primerjava produkcije N₂O in (B) Primerjava optične gostote pri 650 nm (OD₆₅₀) med vibriji v bogatem gojišču PKS z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO₃ (*V. sp.*, *V. gazogenes*, *V. ruber*, *V. rhizosphaerae*) po 24 urah rasti pri 28 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti ali in v kolikšnih količinah bakterija *Vibrio sp.* proizvaja N₂O in kako izbrani okoljski dejavniki vplivajo na učinkovitost produkcije N₂O in prirast biomase pri bakteriji *Vibrio sp.* DSM14379, denitrifikatorski bakteriji *Pseudomonas stutzeri* JM300 in sorodnih bakterijah *Vibrio sp.* (*Vibrio gazogenes*, *Vibrio ruber* in *Vibrio rhizosphaerae*).

5.1 PRIMERJAVA PRODUKCIJE N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.* PRI RASTI V MINIMALNEM GOJIŠČU Z ALI BREZ DODATKA ACETILENA

Dokazali smo, da (Slika 3A):

- Bakterija *Vibrio sp.* proizvaja N₂O.
- Prisotnost acetilena ne vpliva na učinkovitost proizvodnje N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.*
- Učinkovitost proizvodnje N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* v minimalnem gojišču je 150-300 krat nižja od učinkovitosti proizvodnje pri pravem denitrifikatorju bakteriji *Pseudomonas stutzeri* JM300, ki smo jo gojili z dodatkom acetilena.

Rezultat, da bakterija *Vibrio gazogenes* ne proizvaja N₂O se sklada s pričakovanji, saj je v literaturi navedeno, da ta bakterija ni sposobna prvega koraka denitrifikacije t.j. pretvorbe nitrata do nitrita (Farmer in sod., 1988). Dodatek acetilena nima nobenega zaznavnega vpliva na produkcijo N₂O, kar kaže, da se denitrifikacija pri bakteriji *Vibro sp.* zaustavi na stopnji N₂O. Nasprotno ima aceten izrazit vpliv na produkcijo N₂O pri bakteriji *Pseudomonas stutzeri* JM300, ki je predstavnik pravih denitrifikatorjev. Količina proizvedenega N₂O se je pri tej bakteriji ob gojenju v prisotnosti acetilena poveča do 1300 krat. Ta razlika v učinkovitosti proizvodnje ob dodatku acetilena je bila pričakovana. Nismo pa pričakovali, da bomo pri gojenju bakterije *Pseudomonas stutzeri* JM300 brez dodatka acetilena zaznali N₂O. V literaturi namreč ni mogoče zaslediti, da bi ta bakterija v normalnih razmerah proizvajala zunajcelični N₂O, ampak ves N₂O pretvori v N₂ (Carlson in Ingraham, 1982).

5.2 VPLIV KONCENTRACIJE GLUKOZE NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.*

Učinkovitost proizvodnje N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* se zmanjšuje z večanjem koncentracije glukoze v gojišču. To bi lahko razložili s tem, da je pri višji koncentraciji glukoze zraslo več bakterij (več biomase) medtem, ko je bila koncentracija končnega prejemnika elektronov (nitrata) za proizvodnjo N₂O nespremenjena. Posledično je bila dostopnost nitrata pri višji koncentraciji glukoze manjša. Druga možna razlaga je, da glukoza na nek način inhibitorno deluje na proces proizvodnje N₂O. Npr. Smith in Zimmerman (1981) sta pri bakterijah *Citrobacter* in *Bacillus*, Bleakly in Tiedje 1982 pa pri enterobakterijah ugotovila, da višja koncentracija glukoze zmanjša učinkovitost proizvodnje N₂O ter pospeši fermentativni metabolizem in tvorbo NH₄⁺. Nobene od teh možnosti v diplomski nalogi nismo dodatno preverili.

5.3 VPLIV DODATKA NITRATA V GOJIŠČE NA UČINKOVITOST PROIZVODNJE N₂O PRI BAKTERIJI *Vibrio sp.*

Bakterija *Vibrio sp.* brez dodatka nitrata tvori zelo malo ali nič N₂O, ob dodatku nitrata pa je proizvodnja znatno večja. Rezultati so v skladu s pričakovanji in kažejo, da bakterija zelo verjetno potrebuje nitrat kot končni prejemnik elektronov za odstranjevanje viška elektronov v anaerobnih razmerah. Dodatek nitrata v minimalnem gojišču ni imel statistično značilnega vpliva na rast *Vibrio sp.* Za razliko je v bogatem gojišču bakterija *Vibrio sp.* rasla do dvakrat bolje pri višji koncentraciji dodanega nitrata. Ti rezultati kažejo, da bakterija redukcije nitrata v minimalnem gojišču ne izrablja za pomemben prirast biomase. Po drugi strani bi v bogatem gojišču, kjer je prisotno več sproščenih elektronov, celica lahko uporabila nitrat, da se znebi odvečnih elektronov in s tem bolje raste. Opazili smo, da je bila učinkovitost produkcije N₂O v bogatem gojišču z dodatkom nitrata znatno višja (vsaj osemkrat višja) od gojenja v minimalnem gojišču, kar je skladno z opaženo boljšo rastjo *Vibrio sp.* v bogatem gojišču.

5.4 PRIMERJAVA UČINKOVITOSTI PROIZVODNJE N₂O PRI BAKTERIJAH *Vibrio sp.*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio ruber*, *Vibrio rhizosphaerae* in *Pseudomonas stutzeri* JM 300

Proizvodnje N₂O pri sorodnih bakterijah *Vibrio gazogenes* in *Vibrio rhizosphaerae* nismo zaznali. Bakterija *Vibrio sp.* je bila okrog dvakrat učinkovitejša pri proizvodnji N₂O kot bakterija *Vibrio ruber*, kar je glede na veliko stopnjo sorodnosti nepričakovano. Poleg tega smo pričakovali, da bakterija *Vibrio ruber* ne bo proizvajala N₂O, saj so Sheih in sodelavci (2003) pri opisu tipskega seva bakterije *Vibrio ruber* *VRI^T* navedli, da je sposoben reducirati nitrat do nitrita, vendar ne do N₂O ali N₂. V bogatem gojišču se je učinkovitost bakterije *Vibrio sp.* precej približala učinkovitosti pravega denitrifikatorja *P. stutzeri* in je bila približno petkrat manjša od učinkovitosti le tega v bogatem gojišču. To razmerje je bistveno višje od razmerja na minimalnem gojišču, kjer je bila bakterija *Pseudomonas stutzeri* v povprečju 250 krat učinkovitejša od bakterije *Vibrio sp.*

Kot je razvidno iz Preglednice 2 je *Vibrio sp.* v primerjavi z ostalimi nesorodnimi nedenitrifikatorskimi sevi 2-5 krat učinkovitejši pri proizvodnji N₂O. V primerjavi z denitrifikacijskimi sevi je bakterija *Vibrio sp.* precej bolj učinkovita od nerespiratornega denitrifikatorja *Enterobacter aerogenes* ali respiratornega denitrifikatorja *Acromobacter cycloclastes*. Denitrifikatorska učinkovitost je pri bakteriji *Vibrio sp.* občutno manjša od *P. stutzeri*, kar se sklada z rezultati te študije.

Preglednica 2: Primerjava količine proizvedenega N₂O (n N₂O/m proteina [nmol/mg]) pri bakterijah *Vibrio sp.*, *Vibrio ruber*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio rhizosphaerae* in *Pseudomonas stutzeri* v bogatem gojišču z dodatkom 0,5 % (w/V) KNO₃ in dodatkom 10 % (V/V) acetilena ter podatki za ostale mikroorganizme iz literature.

Tip mikroorganizma	Ime mikroorganizma	količina proizvedenga N ₂ O (n N ₂ O/m proteina) [nmol/mg]	gojišče	vir
nedenitrifikator	<i>Propionebacterium sp.</i>	60,0	bogato	Kaspar, 1982
nedenitrifikator	<i>Citrobacter sp.</i>	132,5	minimalno	Smith, 1982
nerespiratorni nitrifikator	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,4	bogato	Mahne in Tiedje, 1995
respiratorni denitrifikator	<i>Acromobacter cycloclastes</i>	145,5 ± 34,5	bogato	Mahne in Tiedje, 1995
respiratorni denitrifikator	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1920 ± 306	bogato	Mahne in Tiedje, 1995
	<i>Vibrio sp.</i> DSM14379	319 ± 58,7	bogato	
	<i>Vibrio ruber</i> DSM16370	184,8 ± 31,4		
	<i>Vibrio gazogenes</i> DSM21264	0,4 ± 0,3		
	<i>Vibrio rhizosphaerae</i> DSM18581	0,3 ± 0,1		
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300	1607,2 ± 495,2		

5.5 SKLEPI

Z našimi eksperimenti smo potrdili, da:

- Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja N₂O
- Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 proizvaja več N₂O kot njeni najbližji sorodniki bakterije *Vibrio gazogenes*, *Vibrio rhizosphaerae* in *Vibrio ruber*, vendar manj kot pravi denitrifikator, bakterija *Pseudomonas stutzeri* v prisotnosti acetilena.
- prisotnost acetilena ne vpliva na produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.*
- glukoza negativno deluje na učinkovitost produkcije N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.*
- za produkcijo N₂O je pri bakteriji *Vibrio sp.* potreben dodatek nitrata
- bakterija *Vibrio sp.* v bogatem gojišču z nitratom vsaj osemkrat učinkoviteje proizvaja N₂O, kot v minimalnem gojišču z nitratom

6 POVZETEK

Didušikov oksid je dolgoživ toplogredni plin in prispeva 5-6 % k skupnemu toplogrednemu učinku (Houghton in sod., 2007) njegova koncentracija v ozračju se povečuje zaradi rabe mineralnih gnojil in sežiganja fosilnih goriv. Glavni ponor N₂O v atmosferi so reakcije N₂O s kisikom pri čemer nastajaja dušikov oksid (NO), ki reagira z ozonom in ga na ta način razgrajuje (Crutzen, 1970). Glavni poti po katerih nastaja N₂O v vodnem okolju sta mikrobna avtotrofna nitrifikacija in respiratorna denitrifikacija. (Bonin in sod., 2002). Denitrifikacijo v glavnem izvajajo fakultativni anaerobi, ki nitrat uporabijo namesto kisika kot končni prejemnik elektronov. V morskem okolju so estuariji in obalna področja poznani kot aktivna mesta za produkcijo N₂O. Visok vnos hranil iz kopnega in globljih delov morja stimulira mikrobne procese vključene v produkcijo N₂O. Zato iz priobalnih voda ki zavzemajo le 20 % morske površine izvira kar 50 % morskega N₂O. Bakterija *Vibrio sp.* DSM14379 je bila izolirana iz Škocjanskega zatoka (Stopar in sod., 2004) in pretvarja nitrat do plinastih produktov, kar je redkost za bakterije iz rodu *Vibrio*, saj ti ne spadajo med tipične denitrifikatorje. V diplomskem delu smo proučevali produkcijo N₂O pri bakteriji *Vibrio sp.* DSM14379 ter jo primerjali s produkcijo pri njenih najbližjih sorodnikih *Vibrio ruber* DSM16370, *Vibrio gazogenes* DSM21264, *Vibrio rhizosphaerae* DSM18581 ter pravem denitrifikatorju *Pseudomonas stutzeri* JM300. V ta namen smo bakterije gojili v anaerobnih pogojih v različnih tekočih gojiščih (minimalno gojišče M9 za *Vibrio* oziroma gojišče M9 za *E. coli*) ter gojišče PKS ali PKE. V minimalnem gojišču smo proučevali vpliv različnih koncentracij glukoze in KNO₃ na produkcijo. V bogatem gojišču smo proučevali vpliv različne koncentracije KNO₃. Vse mikroorganizme smo gojili 24 ur v anaerobnih razmerah z ali brez dodatka acetilena pri 28 °C, po tem času smo izmerili optično gostoto (OD₆₅₀), nastali N₂O in koncentracijo proteina v vzorcu.

Dobljeni rezultati kažejo, da bakterija *Vibrio sp.* proizvaja več N₂O, kot najbližji sorodniki, vendar manj kot pravi denitrifikator *Pseudomonas stutzeri* JM300. Ugotovili smo tudi da, acetilen nima vpliva na produkcijo N₂O pri bakterijah iz rodu *Vibrio*, da bakterija *Vibrio sp.* potrebuje za produkcijo N₂O dodatek nitrata v gojišče in da prisotnost nitrata v

bogatem gojišču pozitivno vpliva na prirast biomase pri bakteriji *Vibrio sp.*, medtem ko v minimalnem gojišču nima značilnega vpliva. Zanimivo je tudi dejstvo, da je bakterija učinkoviteje proizvajala N₂O v bogatem gojišču (vsaj osemkrat učinkoviteje kot v minimalnem), kar kaže na to, da bakterija v pogojih, ko ima na voljo nitrat in veliko hranil uporablja nitrat kot alternativni prejemnik elektronov s čemer poveča prirast biomase.

7 VIRI

Bleakley B.H., Tiedje J.M. 1982. Nitrous oxide production by organisms other than nitrifiers or denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 6: 1342-1348.

Bock E., Koops H.P., Harms H. 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. V: Nitrification. Prosser J.I. (Ed.). Oxford, IRL Press: 17-38.

Bonin P., Tamburini C., Michotey V. 2002. Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research*, 36: 722-732.

Bouwman A.F. 1995. Compilation of a global inventory of emissions of nitrous oxide. Doctoral thesis. Wageningen, Landbouwniversiteit: 143 str.

Buchman R.E. 1917. Studies on nomenclature and classification of the bacteria. III. The families of Eubacteriales. *Journal of Bacteriology*, 2: 347-350.

Carlson C.A., Ingraham J.L. 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 4: 1247-1253.

Crutzen P.J. 1970. The influence of nitrous oxide on the atmospheric ozone content. *Quarterly Journal of Royal Meteorological Society*, 96: 320-327.

Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio sp.* Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 43-76.

Farmer J.J., Hickman-Brenner F.W., Fanning G.R., Gordon C.M., Brenner D.J. 1988. Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 10: 1993-2000.

Forster P., Ramaswamy V., Artaxo P., Bernsten T., Betts R., Fahey D.W., Haywood J., Lean J., Lowe D.C., Myhre G., Nganga J., Prinn R., Raga G., Schulz M., Van Dorland R. 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. V: Climate change 2007: The physical science basis. Contribution of working group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Solomon, S., Qin D., Manning M, Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M. and Miller H.L. (eds). Cambridge, Cambridge University Press: 131 – 234.

Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2005. Host physiological status determines phage-like particle distribution in the lysate. FEMS Microbiology Ecology, 55, 1: 136-145.

Harwood C.S. 1978. *Beneckea gazogenes* sp. nov., a red facultatively anaerobic, marine bacterium. Current Microbiology, 1: 233-238.

Hochstein L.I., Tomlinson G.A. 1988. The enzymes associated with denitrification. Annual Review of Microbiology, 42: 231-261.

Radiative forcing of climate change. 1996. V Climate change 1995. The science of climate change. Contribution of Working Group 1 to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Houghton J.T., Meira Filho L.G., Callander B.A., Harris N., Kattenberg A., Maskell K. (Ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 65-132.

Hynes R.K., Knowles R. 1984. Production of nitrous oxide by *Nitrosomonas europaea*: effects of acetylene, pH and oxygen. Canadian Journal of Microbiology, 30: 1397- 1404.

Kaspar H.F. 1982. Nitrite reduction to nitrous oxide by propionibacteria: Detoxication mechanism. Archives of Microbiology, 133, 2: 126-130.

Knowles R. 1982. Denitrification. Microbial Reviews 46, 1: 43–70.

Kroeze C. 1994. Nitrous oxide and global warming. *Science of Total Environment*, 143, 2-3: 193–209.

Kumar N.R., Nair S. 2007. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2241–2246.

Mahne I., Tiedje J.M. 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3: 1110-1115

Murray R.E., Knowles R. 2003. Production of NO and N₂O in the presence and absence of C₂H₂ by soil slurries and batch cultures of denitrifying bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 35: 1115-1122.

Poth M., Focht D.D. 1985. N kinetic analysis of N₂O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 1134-1141.

Radiative forcing of climate change. 1996. V: *Climate change 1995. The science of climate change. Contribution of Working Group 1 to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Houghton J.T., Meira Filho L.G., Callander B.A., Harris N., Kattenberg A., Maskell K. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 65-132.

Robertson L.A., Cornelisse R., de Vos P., Hadiotemo R., Kuenen J.G., 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56: 289-299.

Schlegel H. 1992. *General microbiology*. 7th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 382-386.

Seitzinger S.P., Kroeze C. 1998. Global distribution of nitrous oxide production and N inputs in freshwater and coastal marine ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles*, 12: 93–113.

Senga Y., Mochida K., Fukumori R., Okamoto N., Seike Y. 2006. N₂O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H₂S on dissimilatory nitrate reduction. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67: 231-238.

Shieh W.Y., Chen Y.W., Chaw S.M., Chiu H.H. 2003. *Vibrio ruber sp. nov.*, a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.

Smith M.S. 1982. Dissimilatory reduction of NO₂⁻ to NH₄⁺ and N₂O by a soil *Citrobacter sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 4: 854-860.

Smith M.S., Zimmerman, K. 1981. Nitrous oxide production by nondenitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal*, 45: 865-871.

Stopar D., Černe A., Žigman M., Poljšak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47: 1-8.

Wood P.M. 1986. Nitrification as bacterial energy source. V: Nitrification. Prosser J.I. (ed.). Oxford, Oxford IRL Press: 39-62.

Wrage N., Velthof G.L., Van Beusichem M.L., Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1723-1733.

Yoshinari T., Hynes R., Knowles R. 1977. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 9: 177-183.

ZAHVALA

Za pomoč pri nastanku diplomskega dela se iskreno zahvaljujem

mentorju **prof. dr. Davidu Stoparju** za številne strokovne nasvete, predloge, popravke, prijaznost in spodbudo med samim eksperimentiranjem in pri pisanju diplome,

dr. Tjaši Danevčič, ki mi je bila zmeraj na voljo s številnimi nasveti pri nastavitvi eksperimentov, delu v laboratoriju, mi posojala gojišča in druge kemikalije in nenazadnje potrpežljivo odgovarjala na moja vprašanja in pomagala pri pisanju končnega izdelka,

recenzentki **prof. dr. Romani Marinšek Logar** za recenzijo pisnega izdelka,

predsednici komisije na zagovoru diplomske naloge **prof. dr. Ines Mandić Mulec**,

Simoni Leskovec za potrpljenje in nasvete,

Tjaši Drčar in **Benko Juliji** za posojene kemikalije, gojišča in jemanje gojišč iz avtoklava,

Tomažu Rakuši, ki mi je pomagal pri oblikovanju naloge in mi tudi drugače pomagal, mi svetoval in me spodbujal,

vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo.

Zahvaljujem se tudi

staršema, ki sta me spodbujala in podpirala ves čas študija,

vsem profesorjem in **asistentom** iz Biotehniške fakultete za znanje, ki so mi ga pomagali osvojiti.