

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

MAGISTRSKA NALOGA

Tjaša MATJAŠIČ

Maribor, 2016

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

Tjaša MATJAŠIČ

MIKROBIOTA SAPIŠČ PRI IZBRANIH VRSTAH PROSTOŽIVEČIH PTIC

MAGISTRSKA NALOGA

Mentor:izr. prof. dr. Janja TRČEK

Somentor: red. prof. dr. Franc JANŽEKOVIČ

Maribor, 2016

IZJAVA O AVTORSTVU

Magistrsko delo je nastalo kot rezultat lastnega dela. Vsi privzeti podatki so citirani skladno z mednarodnimi pravili o varovanju avtorskih pravic.

Podpisana Tjaša Matjašič izjavljam, da sem za potrebe arhiviranja oddala elektronsko verzijo zaključnega dela v Digitalno knjižnico Univerze v Mariboru. Magistrsko delo sem izdelala sama ob pomoči mentorice in somentorja. V skladu s 1. odstavkom 21. člena Zakona o avtorskih in sorodnih pravicah (Ur. l. RS, št. 16/2007) dovoljujem, da se zgoraj navedeno zaključno delo objavi na portalu Digitalne knjižnice Univerze v Mariboru. Tiskana verzija magistrskega dela je istovetna elektronski verziji, ki sem jo oddala za objavo v Digitalno knjižnico Univerze v Mariboru. Podpisana izjavljam, da dovoljujem objavo osebnih podatkov, vezanih na zaključek študija, in sicer za spremljanje zaposlovanja diplomantov za potrebe Kariernega centra ter Alumnih klubov.

Tjaša MATJAŠIČ

Matjašič, T.: Mikrobiota sapišč pri izbranih vrstah prostoživečih ptic. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2016.

IZVLEČEK

Ptiči so skupina živali, ki naseljuje najrazličnejše habitate in so razširjeni po vsem svetu. Zaradi sposobnosti letenja lahko premagujejo zelo velike razdalje. Ker so potencialni prenašalci patogenih mikroorganizmov, lahko le-te razširjajo po obsežnem geografskem območju. Mikrobiota v ptičjem črevesju, na njihovi koži in v dihalih, vpliva tudi na fiziološko stanje ptic. Informacije o njeni diverziteti so zato pomembne za preprečevanje širjenja patogenih mikroorganizmov, kot tudi za ohranjanje ogroženih vrst ptic.

Ptičem smo vzeli brise na treh telesnih območjih: podperut, kloaka in sapišče. Ker je bil eden od ciljev naloge ugotavljanje prisotnosti bakterije *Acinetobacter baumannii*, smo vzorce nanesti na selektivno gojišče za osamitev te bakterije. Omenjena bakterija je znana povzročiteljica bolnišničnih okužb. V drugem pristopu smo njeno prisotnost ugotavljali neposredno s PCR-pomnoževanjem odseka gena *bla*_{OXA-51-like}, ki je naravno prisoten v tej bakteriji. Bakterije *A. baumannii* v vzorčenih ptičih nismo identificirali z nobenim od obeh uporabljenih pristopov. Hkrati smo iz vzorcev, odvzetih iz sapišč, preiskali celokupno kultivabilno bakterijsko mikrobioto. Iz morfološko različnih bakterijskih kolonij smo s precepljanjem pridobili čiste kolonije in jih identificirali na osnovi preiskovanja nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNK. Od skupno 102 bakterijskih izolatov, ki smo jih osamili iz 15 različnih vrst ptic, smo identificirali 69 različnih vrst bakterij, ki so pripadale 22 različnim družinam in štirim različnim deblom. Od tega je 51 % izolatov pripadalo deblu Actinobacteria, 30 % Proteobacteria, 15 % Firmicutes in 4 % Bacteroidetes. Identificirali smo tudi tri potencialno nove vrste bakterij: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 in *Chryseobacterium* sp. 60H-4.

Ugotovili smo, da je sapišče ptičev ekološka niša z značilnimi okoljskimi bakterijami. Mikrobiota sapišč žužkojedih ptic je bila revnejša v smislu vrstne pestrosti in deleža zastopanosti posameznih vrst v primerjavi z vsejedimi pticami. Med identificiranimi bakterijami je bilo 13 vrst (18,8 %) oportunističnih za ljudi in sedem (10,1 %) za rastline.

Ključne besede: ptiči, mikrobiota sapišč, prehrana, *Acinetobacter baumannii*

Matjašič, T.: The microbiota from choanae of selected free living birds species. Master of Science Thesis, University v Mariboru, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Department of Biology, 2016.

ABSTRACT

Free-living birds are scattered across the world. Because of their mobility (flying) they can conquer great distances and are therefore a potential risk factor when it comes to spreading of pathogenic microorganisms across wide geographical areas. Microbiota of gut, skin and respiratory tract are important for the birds' health. More detailed knowledge of these microbiomes would be important for prevention of spreading the pathogenic microorganisms and for preserving endangered bird species.

We took samples from the area under the wing, from cloaca and choana. One of the goals of our research was isolation of the species *Acinetobacter baumannii*. First we used a selective medium to search for this well-known causative agent of hospital-acquired infections. We also tried to detect this bacterial species directly through PCR amplification of the naturally present gene *bla_{OXA-51-like}* in *A. baumannii*. Neither of the mentioned methods yielded positive results. At the same time we investigated the total cultivable microbiota in samples taken from choana. From morphologically different bacterial colonies we obtained isolates and identified them based on their 16S rRNA gene sequences. From the total number of 102 bacterial isolates, isolated from 15 different bird species, we identified 69 different bacterial species, classified into 22 different families and four different phyla. They belonged to phylum Actinobacteria (51 %), Proteobacteria (30 %), Firmicutes (15 %) and Bacteroidetes (4 %). We also identified three potentially novel bacterial species: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 and *Chryseobacterium* sp. 60H-4.

We have found that bird's choana is an ecological niche with typical environmental bacteria. The choanal microbiota of insectivores was poorer in terms of composition and species richness compared to omnivores. Thirteen (18.8 %) identified bacterial species are possibly opportunistic to humans and seven (10.1 %) to plants.

Key words: birds, choanal microbiota, diet, *Acinetobacter baumannii*

KAZALO VSEBINE

IZJAVA O AVTORSTVU	II
IZVLEČEK	III
ABSTRACT	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
PRILOGE	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROBIOTA PTIČEV	3
2.2 SAPIŠČE ALI HOANA (LAT. CHOANA)	6
2.3 SODOBNI PRISTOPI ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ	7
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 VZORCI	11
3.1.2 KEMIKALIJE	12
3.1.3 IZOLACIJA DNK IN ČIŠČENJE PCR-POMNOŽKOV	13
3.1.4 RASTNA GOJIŠČA	14
3.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA	14
3.2 METODE	15
3.2.1 VZORČENJE PTIC	16
3.2.2 OSAMITEV BAKTERIJ	16
3.2.3 OSNOVNA MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJSKIH KOLONIJ	16
3.2.4 ANALIZA MALDI-TOF	17
3.2.5 OSAMITEV DNK	17
3.2.6 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	17
3.2.7 ELEKTROFOREZA V AGAROSNEM GELU	18
3.2.8 PRIPRAVA VZORCA ZA DOLOČITEV ZAPOREDJA 16S rDNK	18
3.2.9 DOLOČANJE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	18
3.2.10 ANALIZA NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ	18
3.2.11 STATISTIČNE METODE	19
4 REZULTATI	20
4.1 OSAMITEV IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ	20

4.1.1	MORFOLOŠKA KARAKTERIZACIJA BAKTERIJ	21
4.1.2	ANALIZA MALDI-TOF	22
4.1.3	OSAMITEV DNK	22
4.1.4	POMNOŽEVANJE GENOV ZA 16S rRNK.....	23
4.1.5	IDENTIFIKACIJA IZOLATOV	23
4.2	ISKANJE POVEZAV MED VRSTAMI BAKTERIJ IN VRSTAMI PTIČEV	31
4.2.1	STUDENTOV T-TEST	40
4.2.2	FISHERJEV TEST	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	42
5.1	RAZPRAVA	42
5.2	SKLEPI.....	46
6	POVZETEK.....	47
7	ZAHVALA	49
8	VIRI.....	50
	PRILOGE.....	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Ustna votlina kadavra ptiča z označenim sapiščem (med puščicama)	7
Slika 2: Shema poteka dela.	15
Slika 3: Primer slike elektroforeznega gela po preverjanju uspešnosti osamitve DNK.	22
Slika 4: Primer slike elektroforeznega gela po čiščenju produktov PCR. Na prvi progi je velikostni standard DNK, nato sledijo vzorci kot navedeno nad sliko.....	23
Slika 5: Delež posameznih bakterijskih debel, osamljenih iz sapišč ptičev.	24
Slika 6: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Actinobacteria v mikrobioti sapišč. ...	25
Slika 7: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Proteobacteria v mikrobioti sapišč. ...	26
Slika 8: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Firmicutes v mikrobioti sapišč.	27
Slika 9: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Bacteroidetes v mikrobioti sapišč.....	27
Slika 10: Filogenetska uvrstitev izolata <i>Aeromicrobium</i> sp. 9H-4 med druge tipske vrste iz rodu <i>Aeromicrobium</i>	28
Slika 11: Filogenetska uvrstitev izolata <i>Agromyces</i> sp. 63H-5 med druge tipske vrste iz rodu <i>Agromyces</i>	29
Slika 12: Filogenetska uvrstitev izolata <i>Chryseobacterium</i> sp. 60H-4 med druge tipske vrste iz rodu <i>Chryseobacterium</i>	30
Slika 13: Osebki grupirani na podlagi skupnega bakterijskega debla v kultivabilni mikrobioti sapišč.	34
Slika 14: Osebki grupirani na podlagi skupnega bakterijskega reda v kultivabilni mikrobioti sapišč..	35
Slika 15: Osebki grupirani na podlagi skupnih bakterijskih družin v kultivabilni mikrobioti sapišč.	36
Slika 16: Vrste ptic grupirane na podlagi skupnega bakterijskega debla v kultivabilni mikrobioti sapišč.	37
Slika 17: Vrste ptic grupirane na podlagi skupnega bakterijskega reda v kultivabilni mikrobioti sapišč.	38
Slika 18: Vrste ptic grupirane na podlagi skupne bakterijske družine v kultivabilni mikrobioti sapišč.	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam datumov, ure, kraja in vremenskih razmer v času vzorčenja ptic.	11
Preglednica 2: Seznam vzorčenih ptičev, njihova starost, spol, masa in izmerjena dolžina peruti.	11
Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR.	13
Preglednica 4: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov.	13
Preglednica 5: Seznam vzorčenih ptičev s povprečnim številom poraslih in morfološko različnih bakterijskih kolonij iz sapišč.	21
Preglednica 6: Seznam družin vzorčenih ptičev z nekaterimi njihovimi ekološkimi lastnostmi.	31
Preglednica 7: Seznam vrst, osamljenih iz sapišč prostoživečih ptic, ločenih po skupinah glede na način prehranjevanja ptiča.	32
Preglednica 8: Kontingenčne preglednice za računanje Fisherjevega testa za vrsto <i>S. gallinarum</i> med golobi in ostalimi ptiči.	40
Preglednica 9: Kontingenčne preglednice za računanje Fisherjevega testa za družino Staphylococcaceae med ptiči, ki jedo plodove in semena ter ptiči, ki se hranijo samo z žuželkami ali žuželkami in polži/semeni.	40
Preglednica 10: Kontingenčna preglednica za računanje Fisherjevega testa za družino Staphylococcaceae med ptiči, ki jedo plodove in ostalimi ptiči.	41
Preglednica 11: Seznam za človeka oportunističnih vrst bakterij, ki smo jih izolirali iz sapišč ptic.	44
Preglednica 12: Seznam potencialno fitopatogenih vrst bakterij, ki smo jih izolirali iz sapišč ptic.	44

PRILOGE

Priloga 1: Seznam izolatov z metodo identifikacije, datumom in krajem vzorčenja ptic ter barvo bakterijske kolonije.....	57
--	----

1 UVOD

Ptice so uspešna skupina vretenčarjev, ki naseljujejo najrazličnejše habitate in so razširjeni po vsem svetu (Cramp s sod., 1998). Ptice selivke preletijo velike razdalje in tako lahko razširijo patogene bakterije po velikem geografskem območju (Buck, 1990). Nekatere vrste prostoživečih ptic z razširjanjem svojih iztrebkov v urbanem okolju predstavljajo potencialno nevarnost širjenja patogenih bakterij (Ewers s sod., 2009). Prostoživeče ptice lahko vnesejo bakterije tudi v površinske vode (Wiśniewska s sod., 2007). Ptice so lahko tudi rezervoar za bakterije, ki so odporne proti različnim antibiotikom (Garmyn s sod., 2011). Zaradi okužb, ki jih take bakterije povzročajo (Hidron s sod., 2008), in potencialu ptic kot vektorjev prenašanja mikroorganizmov, je pomembno poznavanje mikrobiote različnih organskih sistemov ptic. Poleg tega je znanje o naravni mikrobioti ptic pomembno tudi zato, ker mikrobiota vpliva na fiziološko stanje ptic in ima pomembno vlogo pri njihovi prebavi in razvoju (Kohl, 2012; van Dongen s sod., 2013). S tem znanjem bi tako lahko pripomogli k ohranjanju ogroženih vrst ptic in kasneje njihovi ponovni naselitvi v naravi (Waite s sod., 2012).

Nekatere vrste bakterij iz rodu *Acinetobacter* povzročajo bolnišnične okužbe, pri tem pa hitro razvijajo odpornost proti številnim antibiotikom. Med več kot 30 opisanimi vrstami bakterij iz tega rodu je vrsta *Acinetobacter baumannii* najpogostejši povzročitelj okužb (Guardabassi s sod., 1999). Čeprav so bile vrste iz rodu *Acinetobacter* izolirane iz pitne in odpadne vode, prsti, različnih virov hrane, ptic in površine človeške kože, je vektor prenosa bakterije *A. baumannii* v naravi še nepoznan (Guardabassi s sod., 1999; Narciso-da-Rocha s sod., 2013).

1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Na začetku raziskave smo se ciljno osredotočili na iskanje bakterije *Acinetobacter baumannii* pri prostoživečih pticah. Ker le-te s klasičnimi gojitvenimi pristopi nismo identificirali v nobeni izmed vzorčenih ptic, smo se osredotočili na naravno mikrobioto zgornjega dela dihal ptic, ki je bila do sedaj slabo raziskana. Naravna mikrobiota sapišč je zaradi svoje lege povezana tako z dihalnim kot tudi s prebavnim traktom ptic. Postavili smo si naslednje cilje:

- ugotoviti sestavo bakterijske mikrobiote v sapiščih pri različnih vrstah ptic,
- ugotoviti, če obstaja povezava med mikrobioto sapišč in prehranjevalnimi navadami posameznih ptic ter
- ugotoviti prisotnost patogenih bakterij v tej še neraziskani ekološki niši.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

- sapišče ptic je rezervoar značilnih okoljskih bakterijskih vrst;
- večina bakterijskih vrst bo pripadala deblu Actinobacteria;
- sapišče ptic je še neraziskana niša, zato v njej pričakujemo tudi nove, še neopisane bakterijske vrste;
- bakterijsko populacijo sapišč sestavljajo tudi bakterije, ki so povzročiteljice zoonoz.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROBIOTA PTIČEV

Študije preiskovanja mikrobiote ptičev so bile do sedaj večinoma usmerjene v iskanje specifičnih vrst patogenih mikroorganizmov, ki okužijo ptiče ali pa jih ti samo prenašajo na človeka in živali.

Tako so Janiga s sod. (2007) izolirali bakterije iz kloak, žrel in iztrebkov prosto živečih odraslih in juvenilnih osebkov sive pevke (*Prunella collaris*), živeče na območju gorske verige Tatre. Vzorce so nacepili na krvni agar in agar Endo, ter jih inkubirali 24 – 48 ur pri 37 °C. Izolate so identificirali na osnovi fenotipskih lastnosti. Iz kloake in žrela 30 ujetih ptic ter 171 iztrebkov so identificirali 13 različnih bakterijskih rodov. Poleti so prevladovali rodovi *Enterococcus*, *Escherichia*, *Hafnia* in *Serratia*, med ostalimi letnimi časi pa *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* in *Yersinia*. Ugotovili so, da je prebavni trakt 46 % vzorčenih odraslih samcev, 75 % vzorčenih odraslih samic in 82 % vzorčenih juvenilnih osebkov okužen z vsaj eno vrsto bakterij. Rodove *Yersinia*, *Hafnia* in *Pantoea* so našli le pri odraslih samcih, rodova *Escherichia* in *Serratia* pa le pri samicah in juvenilnih osebkih, ki so jih ujeli izven gnezd.

Ortega s sod. (2012) so preiskovali prisotnost bakterij iz družine Chlamydiaceae pri prostoživečih pticah. Vzorčili so 54 odraslih ptic, ki so pripadale 14 vrstam in niso kazale znakov bolezni ter 10 juvenilnih ptic, ki so pripadale petim vrstam. Odrasle ptice so vzorčili ob njihovem prihodu v rehabilitacijski center, mladiči pa so bili vzgojeni v centru. Brise so vzeli iz očesne veznice (lat. *conjunctivae*), sapišč in kloake. DNK so izolirali s komercialnim kompletom, nato pa z metodo PCR pomnoževali specifične DNK-regije značilne za družino Chlamydiaceae. Specifične DNK-pomnožke so ugotovili pri odraslih osebkih, ki so pripadali 12 vrstam, predvsem pri postovkah (*Falco tinnunculus*) in beloglavih jastrebih (*Gyps fulvus*), največ v brisih iz očesne veznice (40,6 %), manj v sapiščih (17,2 %), nikoli pa v brisih iz kloake (Ortega s sod., 2012).

Podobno raziskavo kot Ortega s sod. (2012) so objavili Santos s sod. (2012). Preučevali so raznolikost mikrobne združbe kloake pri obrežnih pticah selivkah. Vzorčili so tri različne vrste ptic: rdečenoge martince (*Tringa totanus*), polojnike (*Himantopus himantopus*) ter dve populaciji črnorepih kljunačev (*Limosa limosa*). Izolate so identificirali na osnovi preiskovanja

sekvenc genov za 16S rRNK. Večina pridobljenih izolatov je bila uvrščena v debla Firmicutes in Actinobacteria, manjši delež v Proteobacteria in Deinococcus-Thermus. Našli so tudi potencialno patogene izolate iz rodov *Helicobacter* in *Staphylococcus* pri vseh vrstah ptic ter predstavnike rodov *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Legionella* in *Corynebacterium* pri polojnikih (Santos s sod., 2012).

Tudi Waite s sod. (2012) so ugotovili razlike v mikrobioti med juvenilnimi in odraslimi pticami. Preiskali so mikrobioto prebavnega trakta pri mladičih in odraslih osebkih kritično ogrožene endemične vrste ptice iz Nove Zelandije, *Strigops habroptilus*. Poleg sapišč so vzorčili še posamezne odseke prebavnega trakta, golšo in iztrebke. Pridobili so 13 vzorcev iz zgornjega dela dihal, ki so jih vzeli trem neoperjenim mladičem in trem odraslim pticam. Vzorčili so sapišča in golšo mladičev ter sapišče ene odrasle ptice, odvzeli pa so tudi vzorce iztrebkov. Zaradi težav z brzdanjem odraslih ptic ostalim odraslim pticam golše niso vzorčili. Vzorci so pripadali predvsem deblu Firmicutes in razredu γ -Proteobacteria. Deleža obeh sta bila pri juvenilnih pticah podobna, ne glede na mesto vzorčenja, pri odraslih pa se je delež razlikoval. Pri odrasli ptici, ki so ji vzorčili golšo in iztrebke so prevladovali predstavniki razreda γ -Proteobacteria, podobno je bilo pri drugem odraslem osebku, ki so mu vzorčili iztrebke, pri tretjem odraslem osebku pa so v iztrebkih našli le predstavnike iz debla Firmicutes (Waite s sod., 2012).

Razlike v mikrobioti med juvenilnimi in odraslimi pticami je raziskoval tudi Van Dongen s sodelavci (2013). Med majem in julijem 2009 so z vzorčenjem kloake 43 različno starih (22 odraslih in 21 mladih) triprstih galebov (*Rissa tridactyla*) identificirali 64 bakterijskih operativnih taksonomskih enot (OTU), večinoma iz debel Firmicutes in Actinobacteria, manjši delež pa iz debla Proteobacteria. Vzorčili so posamezne osebke, ki niso bili v sorodu, da ne bi prišlo do prekrivanja, npr. zaradi bivanja v istem gnezdu. Ugotovili so, da se mikrobiota mladih in odraslih ptic razlikuje, da se s časom spreminja, in da je mikrobna struktura pri odraslih osebkih bolj stabilna (van Dongen s sod., 2013).

Leta 2014 so Su s sod. objavili identifikacijo bakterij, ki so jih osamili iz trahej, golše, slepega črevesa in kloak vrste Virginjski kolin (*Colinus virginianus*). Izbrali so 414 morfološko različnih kolonij, namnoženih na neselektivnih, selektivnih in obogatenih gojiščih, ki so jih inkubirali pri aerobnih in anaerobnih pogojih. Z analizo prvih 500 baznih parov (bp) gena za 16S rRNK in biokemijskimi metodami so identificirali 190 vrst, od tega 160 znanih in 30 novih.

Največ vrst je bilo iz debla Firmicutes (57 %), sledila so debla Actinobacteria (24 %), Proteobacteria (17 %) in Bacteroidetes (0,02 %). V študiji so ugotovili, da na sestavo mikrobiote značilno vplivajo starost, spol in tip tkiva. Iz več mladičev so izolirali rod *Paenibacillus*, ki je splošno razširjen v rizosferi, krmi in ličinkah žuželk, njegov delež pa je bil večji pri mladičih kot pri odraslih živalih (Su s sod., 2014).

Vela s sod. (2015) so opisali komenzalne in patogene bakterije kloak in žrel 75 evrazijskih beloglavih jastrebih (*Gyps fulvus*) iz dveh različnih območij (Katalonija in Navarra). Vzorčili so zdrave osebkke v obdobju osmih mesecev (oktober 2010 – maj 2011). Vzorce so shranili na 4 °C, bakteriološko analizo pa so opravili v 48 urah po vzorčenju. Nacepili so jih na agar Columbia z dodano ovčjo krvjo in plošče inkubirali pri aerobnih in anaerobnih pogojih 48 ur pri 37 °C. Pridobili so 517 bakterijskih izolatov, od katerih je bilo 358 po Gramu pozitivnih in 159 po Gramu negativnih. Najpogostejši rodovi so bili *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* in *Lactococcus*, najpogosteje izolirani vrsti pa sta bili *Escherichia coli* in *Enterococcus faecalis*. V desetih vzorcih iz kloake so našli rod *Salmonella*. Zaključili so, da so jastrebi rezervoar nekaterih patogenih bakterij in predlagali periodične sanitarne preglede za preprečevanje njihovega širjenja (Vela s sod., 2015).

Ortega s sod. (2012) so vzorčili sapišča prostoživečih ptic ujed. Za osamitev bakterij iz družine Chlamydiaceae so uporabili selektivna gojišča. Odkrili so, da se sestava mikrobiote sapišč razlikuje od sestave mikrobiote kloak. Stenkat je s sodelavci (2014) preiskoval vzorce, pridobljene iz žrela ptic. Ugotovili so, da je žrelo ptic rezervoar okoljskih bakterij, med njimi tudi potencialno patogenih bakterij. Med potencialno patogenimi bakterijami za ptice in človeka so identificirali vrste *Aeromonas hydrophila*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*.

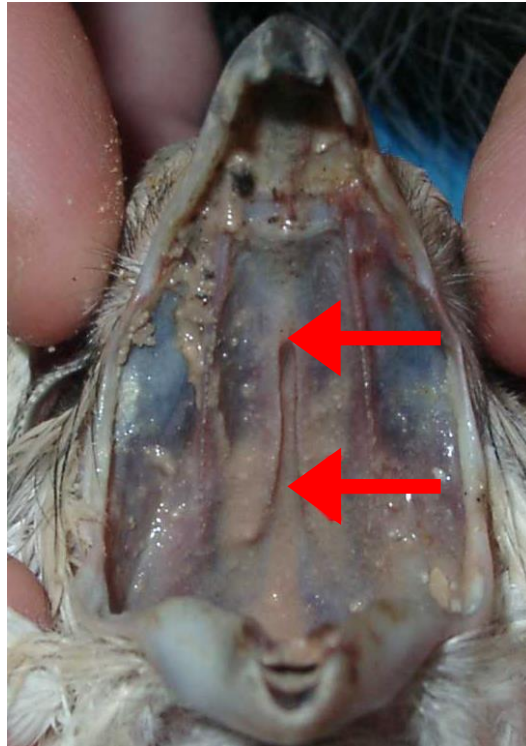
Raziskavo na velikem številu divjih gosi so leta 2011 opravili Garmyn s sod. Vzorčili so 396 prostoživečih gosi (354 *Branta canadensis* in 42 *Anser anser domesticus*), kar je okoli 4 % celotne belgijske populacije, ki je ocenjena na 10.000 osebkov. Vzorce so v roku štirih ur od odvzema vzorca inokulirali na agar MacConkey, ter jih preko noči inkubirali pri 37 °C. Vrsto *E. coli* so identificirali z precepitvijo na agar Columbia z dodano ovčjo krvjo (5 %) ter fenotipskimi testi. Izolatom so z difuzijskim testom določili odpornost na betalaktamske antibiotike, ki predstavlja skupino najbolj pogosto uporabljenih antibiotikov (Holten in Onusko, 2000). Odporne seve so našli pri dveh goseh iz iste regije (Donkmeer, Berlare). Karakterizacija

in sekvenciranje genov, ki kodirajo β -laktamaze, je pri izolatu *E. coli* iz kanadske gosi (*B. canadensis*) odkrila gen *bla_{SHV}*, pri izolatu *E. coli* iz domače gosi (*A. anser domesticus*) pa gen *bla_{TEM}* (Garmyn s sod., 2011).

Raziskave mikrobiote so bistveno bolj pogoste pri sesalcih, vendar pa ti rezultati niso prenosljivi na ptice zaradi posebnih značilnosti ptic, kot je npr. valjenje (Kohl, 2012).

2.2 SAPIŠČE ALI HOANA (LAT. *CHOANA*)

Predstavniki skupine Choanata, med katere spadajo tudi kopenski tetrapodi, imajo hoano – sapišče (slika 1) (Liem s sod., 2001). To je podolgovata cevasta parna struktura, ki povezuje nosno votlino z ustno votlino. Zunanji odprtini sta nosnici, notranji odprtini pa se nahajata v bližini rostralnega dela ustne votline (Baumel, 1979; King in McLelland, 1979; Liem s sod., 2001). Sestavljena je iz rostralnega dela (lat. *pars rostralis*) in kavdalnega dela (lat. *pars caudalis*). Predvidevajo, da je rostralni del homologen nebnemu šivu pri sesalcih. Kavdalni del je trikotna odprtina, ki se nahaja kavdalno od čeljustno nebnega podaljška med nebniema kostema. Dorzalno je v sredini razdeljena z ralom (lat. *vomer*) in nosnim pretinom (lat. *septum nasale*) (Golob, 2011).



Slika 1: Ustna votlina kadavra ptiča z označenim sapiščem (med puščicama)
(http://www.themodernapprentice.com/choanal_gyr.jpg, Lydia Ash, 2004 - 2015).

2.3 SODOBNI PRISTOPI ZA IDENTIFIKACIJO BAKTERIJ

Identifikacija bakterij je sistematičen proces. Pomembno je, da najprej izoliramo čisto kulturo (populacija samo ene vrste mikroorganizma, ki je morfološko in genotipsko homogena), saj je le tako bakterijo mogoče identificirati. Izoliramo jo z večkratnim cepljenjem do posameznih kolonij. Pri tem uporabimo trda gojišča s kompleksno sestavo, če želimo preučevati celokupno kultivabilno mikrobioto, ali pa s specifično sestavo, če želimo izolirati točno določeno skupino bakterij. Ko imamo čisto kulturo, nadaljujemo z opazovanjem morfoloških značilnosti, kot so oblika in vonj kolonij na trdem gojišču, tip hemolize na krvnem agarju itd.. Pod mikroskopom lahko opazujemo obliko celic, njihovo razporeditev, različne strukture in obarvanje po Gramu. Običajno nadaljujemo z ugotavljanjem fizioloških in biokemijskih značilnosti pridobljenih izolatov (Janežič in Trček, 2013).

Klasične fenotipske metode identifikacij bakterij temeljijo na lastnostih, ki jih lahko opazujemo, in ki se izrazijo pri optimalnih pogojih za rast posameznega seva (Petti, 2007). V zadnjih letih pa so se uveljavile predvsem genotipske metode kot standard za identifikacijo neznanega izolata, med njimi še posebno sekvenciranje tarčnega odseka DNK. Ta pristop

identifikacije ne zahteva optimalnih pogojev namnoževanja preiskovanega seva, odčitanje rezultata ni izpostavljeno subjektivni oceni, na osnovi sekvence pa bakterijo tudi lažje uvrstimo v taksonomski sistem. Molekularne metode so tudi hitrejše in zanesljivejše od konvencionalnih fenotipskih metod, posebej za identifikacijo in klasifikacijo gojitveno zahtevnih mikroorganizmov. Hitrost in zanesljivost metod je pomembna predvsem pri kliničnih vzorcih, pa tudi v živilski mikrobiologiji. Izolat lahko identificiramo z dokazom specifičnega gena za določeno vrsto, najpogosteje pa se za identifikacijo uporablja nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNK (Janda in Abbott, 2007; Petti, 2007). Gen ima približno 1500 baznih parov in kodira 16S rRNK, ki je del manjše (30S) podenote ribosoma. Zaporedje gena za 16S rRNK se uporablja zato, ker je ta gen prisoten v vseh bakterijah, njegova funkcija se tekom evolucije ni spreminjala, kar pomeni, da je njegovo nukleotidno zaporedje ostalo zelo ohranjeno. Med ohranjenimi regijami gena za 16S rRNK pa so tudi variabilne regije, ki omogočajo razlikovanje posameznih vrst bakterij (Janda in Abbott, 2007). Pri nekaterih bakterijskih vrstah je gen za 16S rRNA tako ohranjen, da ne omogoča razlikovanja med sorodnimi vrstami. Takšnim organizmom lahko pomnožimo alternativne gene, npr. vzdrževalni gen *rpoB*, ki kodira β -podenoto bakterijske RNK-polimeraze (Petti, 2007).

Za identifikacijo bakterij s sekvenciranjem potrebujemo bazo nukleotidnih zaporedij referenčnih sevov bakterij s katerimi primerjamo sekvence izolatov, ki jih želimo identificirati. Za bakterije, ki jih identificiramo na osnovi primerjav nukleotidnega zaporedja genov za 16S rRNK je priporočena podobnost med sekvenco preiskovanega izolata in referenčnega seva vsaj 95 % za natančno identifikacijo izolata do nivoja rodu in vsaj 98 % za natančno identifikacijo do nivoja vrste. Poleg preiskovanja sekvenc genov za 16S rRNK pa genetsko podobnost med dvema genomoma preiščemo še s hibridizacija DNK-DNK. Uporaba te tehnike pride v poštev predvsem takrat, kadar želimo potrditi, da izolat spada v novo vrsto, nujno potrebno pa jo je izvesti le takrat, kadar sta si preiskovana sekvenca gena za 16S rRNK in homologna sekvenca referenčnega seva podobni >98,7 % (Stackebrandt in Ebers, 2006; Tindall s sod., 2010).

Definicija bakterijske vrste izhaja iz dogovora v mikrobiologiji in ne odraža nujno biološkega dogajanja tekom evolucije. Sevi iste vrste imajo podobne fenotipske (npr. izražanje različnih vrst encimov, zmožnost uporabe različnih virov energije, itd.) in genotipske lastnosti. Tvorijo torej skupino sevov s podobnimi fenotipskimi lastnostmi, ki pa se razlikujejo od skupin sevov, ki pripadajo drugim vrstam (Thompson s sod., 2013). Na nivoju vrste morajo molekularne lastnosti potrditi morfološke, biokemijske in kemotaksonomske lastnosti sevov uvrščenih v isto

vrsto ter opisati skupino sevov v odnosu do drugih filogenetsko sorodnih vrst istega rodu. Za potrditev, da sta dva izolata različni vrsti je najpogosteje uporabljena tehnika hibridizacija DNK-DNK (Stackebrandt in Ebers, 2006).

Bakterijska vrsta je definirana kot skupina sevov, katerih podobnost je >70 % po hibridizaciji DNK-DNK, ki imajo >98 % identičnost nukleotidnega zaporedja za 16S rRNK, se razlikujejo v vsebnosti G+C genomske DNK <5 %, in se razlikujejo v temperaturi tališča genomske DNK <5 %. Eden izmed sevov opisanih kot nova bakterijska vrsta mora biti izbran kot tipski sev in mora biti pred opisom nove vrste shranjen v vsaj dve mednarodni zbirki mikroorganizmov ter tako dostopen vsem, ki bi želeli ponoviti eksperimente ali bi ga potrebovali za nadaljnje raziskave (Thompson s sod., 2013).

Ker tehnologija sekvenciranja postaja vedno bolj cenovno dostopna, jo laboratoriji že uporabljajo za rutinsko identifikacijo bakterij. Domnevamo lahko, da bo v prihodnosti sekvenciranje celotnih genomov postalo standard v mikrobni taksonomiji. Thompson in sodelavci (2013) so predlagali definicijo vrste na osnovi analize in primerjave celotnih genomov bakterij. Po takšni analizi bi imeli sevi enake vrste >95 % podobnosti v povprečni nukleotidni sestavi genov in >70 % podobnost po *in silico* hibridizaciji DNK-DNK.

Metoda, ki jo pogosto uporabljamo za identifikacijo bakterij v medicinski mikrobiologiji, se imenuje MALDI-TOF (ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo in masnim analizatorjem na čas preleta ionov). S to avtomatizirano metodo določimo profil (masni spekter) biopolimerov (DNA, proteini in sladkorji) v bakterijski celici. Ker imajo različne vrste bakterij različne masne spektre, jih lahko uporabimo za identifikacijo bakterij. To nam omogoča identifikacijo bakterijskih vrst ali rodov v nekaj minutah, kar je še posebej pomembno pri diagnosticiranju bolezni. Pri tem je pomembna referenčna baza podatkov, ki je na voljo (Janežič in Trček, 2013).

Analizo MALDI-TOF sestavljajo tri osnovne faze: ionizacija, separacija in detekcija. Vzorec se na posebni ploščici pomeša z raztopino matriksa, s katero nato kristalizira. Matriks sestavljajo različne organske spojine z nizko molekularno maso in je pomemben zato, ker absorbira energijo laserja in tako omogoči ionizacijo vzorca in njegov prehod v plinasto stanje. Ionizirane molekule nato potujejo v elektromagnetnem polju proti cevi z vakuumom, kjer se ločijo glede na hitrost. Ta pa je odvisna od razmerja med maso in nabojem ionov. Večji ioni oz. tisti z večjim razmerjem med maso in nabojem potujejo počasneje. Vzorec tako sestavljajo molekule z različnim razmerjem med maso in nabojem, ki jih loči analizator TOF. Ko molekule

pripotujejo do detektorja, ojačevalec ojača signal. Rezultati analize MALDI-TOF so predstavljeni v obliki masnih spektrov, ki jih sestavljajo molekule z različnim razmerjem med maso in nabojem, prikazane pa so v obliki različnih intenzitet (Welker s sod., 2002).

Za analizo z MALDI-TOF lahko uporabimo nepoškodovane celice, celične lizate ali neobdelane bakterijske ekstrakte. Pomanjkljivost te metode je za razliko od sekvenciranja genov slaba ponovljivosti rezultatov zaradi uporabe različnih pogojev rasti bakterij in omejen dostop do referenčnih baz podatkov. V študiji iz leta 2008 je Mellmann s sodelavci preverjal uporabnost metode MALDI-TOF za identifikacijo nefermentirajočih bakterij, ki pogosto okužijo človeka. Za referenčno metodo so uporabili sekvenciranje odseka gena za 16S rRNK. Najprej so pripravili referenčno bazo podatkov z 248 nefermentirajočimi kulturami bakterij, ki so pripadale 37 bakterijskim rodovom, ki najpogosteje okužijo človeka. Nato so to bazo podatkov uporabili za identifikacijo 80 nefermentirajočih bakterij izoliranih iz kliničnih vzorcev. Ugotovili so, da je metoda MALDI-TOF pravilno identificirala 82,5 % izolatov do nivoja vrste in 95,2 % izolatov do nivoja rodu (Mellmann s sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

Prostoživeče ptice smo vzorčili v obdobju med 18. 9. 2013 in 10. 12. 2013 (preglednici 1 in 2).

Preglednica 1: Seznam datumov, ure, kraja in vremenskih razmer v času vzorčenja ptic.

Datum vzorčenja	Čas vzorčenja (ura)	Kraj vzorčenja	Vreme in temperatura
18. 9. 2013	9.20 – 10.40	Pragersko	oblačno, vetrovno, 17°C
4. 10. 2013	8.45 – 10.30	Pragersko	sončno, jasno, 5 °C
15. 10. 2013	8.40 – 10.15	Hajdoše	sončno, jasno, 20 °C
18. 10. 2013	9.45 – 10.35	akumulacija Medvedce (Vrhloga)	sončno, jasno, 10 °C
10. 12. 2013	9.35 – 10.20	Maribor, glavni trg	oblačno, 6 °C

Preglednica 2: Seznam vzorčenih ptičev, njihova starost, spol, masa in izmerjena dolžina peruti.

Vrsta ptiča	Osebek	Starost	Spol	Masa [g]	Dolžina peruti [mm]
golob (<i>Columba livia</i>)	golob 1	ni meritev	ni meritev	ni meritev	ni meritev
	golob 3	ni meritev	ni meritev	ni meritev	ni meritev
	golob 4	ni meritev	ni meritev	ni meritev	ni meritev
	golob 5	ni meritev	ni meritev	ni meritev	ni meritev
trstni strnad (<i>Emberiza schoeniclus</i>)	AZ98041	AD	M	19,6	80
rumeni strnad (<i>Emberiza citrinella</i>)	AZ98042	1	Ž	26,1	83
lišček (<i>Carduelis carduelis</i>)	AZ97063	1	ND	16,3	80
ščinkavec (<i>Fringilla coelebs</i>)	AZ97074	1	Ž	22,4	88
plavček (<i>Parus caeruleus</i>)	AZ98062	1	Ž	10,6	64
poljski vrabec (<i>Passer montanus</i>)	AZ97064	1	ND	22	69
	AZ97065	1	ND	22	69
	AZ97943	1	ND	21,4	71
siva pevka (<i>Prunella modularis</i>)	AZ97048	AD	ND	17	70
	AZ97049	AD	ND	17,4	66
	AZ97050	AD	ND	17,3	68
	AZ98060	AD	ND	19,8	72
črnoglavka (<i>Sylvia atricapilla</i>)	AZ95994	1	Ž	17,8	69
	AZ97059	1	M	17,5	73
kovaček (<i>Phylloscopus trochulus</i>)	KT59201	1	ND	9,2	67

Preglednica 2 (se nadaljuje)

vrnja listnica (<i>Phylloscopus collybita</i>)	KT59202	ND	ND	7,7	57
vrtna penica (<i>Sylvia borin</i>)	AZ95990	1	ND	21,8	77
taščica (<i>Erithacus rubecula</i>)	AZ97908	1	ND	17,1	74
	AZ97913	1	ND	16,1	70
	AZ98057	1	ND	17,2	75
	AZ98058	1	ND	18	73
pogorelček (<i>Phoenicurus phoenicurus</i>)	AZ95991	1	ND	16,1	84
cikovt (<i>Turdus philomelos</i>)	E830205	1	ND	72,4	117

Legenda: 1, enoletnik; AD, odrasel; ND, ni določeno; Ž, samica; M, samec.

3.1.2 Kemikalije

Za analizo DNK in PCR-pomnožkov smo uporabili:

- agarozo,
- 50x TAE (Tris-acetatni) pufer:
 - 242 g/L Tris,
 - 57,1 mL/L očetne kisline,
 - 100 mL/L 0,5 M (EDTA) (pH 8,0),
- 10x pufer za nanos DNK:
 - 475 μ L 2-kratni pufer TE (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8)
 - 475 μ L glicerol,
 - 50 μ L 20 % bromfenol modro,
- 10 mg/mL etidijevega bromida (EtBr) in
- DNK-velikostni standard (Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

Sestava reakcijske mešanice za PCR je navedena v preglednici 3, začetni oligonukleotidi v preglednici 4.

Preglednica 3: Sestava reakcijske mešanice za PCR.

Sestavina	Volumen (μL) v 100 μL reakcijske mešanice
2mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP)	10
100 pmol/ μL začetni oligonukleotid P1	1
100 pmol/ μL začetni oligonukleotid P2	1
10x pufer <i>Taq</i> s KCl (Thermo Scientific)	10
25 mM MgCl_2 (Thermo Scientific)	10
ddH ₂ O (Qiagen)	66,5
5 U/ μL polimeraza <i>Taq</i> (Thermo Scientific)	0,5
tarčna DNK	1

Preglednica 4: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov.

Ciljana skupina	Oznaka začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51-likeF	5'-TAA TGC TTT GAT CGG CCT TG-3'
	OXA-51-likeR	5'-TGG ATT GCA CTT CAT CTT GG-3'
vse bakterije	16S_fw	5'-AAA TTG AAG AGT TTG ATC ATG GC-3'
	rH1542	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'

3.1.3 Izolacija DNK in čiščenje PCR-pomnožkov

Za osamitev in čiščenje DNK smo uporabljali komercialne komplete proizvajalcev Thermo Scientific (USA) in Machery-Nagel (Nemčija).

3.1.4 Rastna gojišča

Za transport vzetih brisov iz površin ptičev smo uporabili transportno gojišče Amies (Copan, Diagnostics).

Za osamitev bakterije *Acinetobacter baumannii* smo uporabljali selektivno gojišče CHROMagar™ *Acinetobacter* (CHROMagar, Francija).

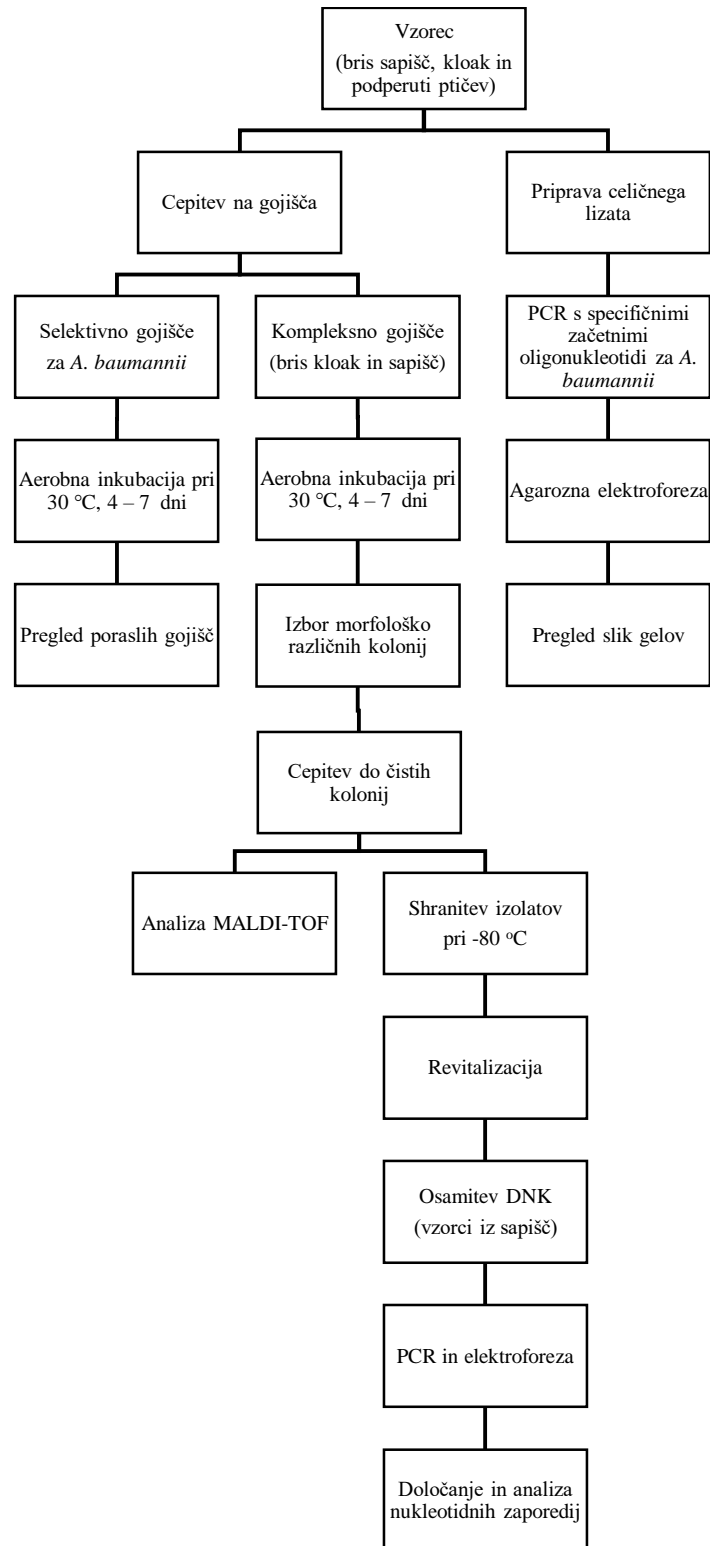
Za osamitev celokupne mikrobiote iz sapišč ptic smo uporabili hranilni agar (NA, Sigma).

3.1.5 Laboratorijska oprema

Pri laboratorijskem delu smo uporabili gorilnike, petrijevke, stojala, cepilne zanke, čaše, erlenmajerice, žličke, merilne valje, mikrocentrifugirke in steklene palčke.

V laboratoriju za mikrobiologijo in molekularno biologijo smo uporabljali standardne aparature, med njimi aparat za PCR, centrifuge, sistem za ločevanje in analizo DNK ter druge.

3.2 METODE



Slika 2: Shema poteka dela.

3.2.1 Vzorčenje ptic

Prostoživeče ptice je ujel ornitolog v okviru rednega obročkanja. Ptice so bile privabljene v bližino najlonskih mrež s pomočjo predvajanega ptičjega petja. Ptiče smo iz najlonskih mrež previdno odstranili in pričeli s postopkom determinacije vrstne pripadnosti, spola in starosti, ter biometričnih meritev (mase in dolžine peruti). Vzorčili smo tri različna mesta: podperut, kloako in sapišče. Odprli smo sterilno prenosno gojišče, vatenko pomočili v fiziološko raztopino ter odvzeli bris površine. Odvzeti bris smo vstavili v priloženo plastično epruveto s prenosnim medijem, jo označili ter dopisali podatke o mestu vzorčenja, vrsti ptice, spolu, starosti, masi, razponu kril ter številko obročka. Vzorce smo takoj po terenskem delu prenesli v laboratorij. Brise smo nacepili na selektivno gojišče za detekcijo bakterije *A. baumannii* in na kompleksno gojišče za detekcijo in izolacijo celokupne mikrobiote. Plošče z gojišči smo inkubirali v aerobni atmosferi pri 30 °C. Iz odvzetih vzorcev smo s kuhanjem pri 95 °C 5 min pripravili celični lizat, ki smo ga v nadaljevanju uporabili za detekcijo bakterije *A. baumannii* s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi v reakciji PCR.

3.2.2 Osamitev bakterij

Po vzorčenju smo brise v roku treh ur nacepili na izolacijska gojišča. Na selektivno gojišče smo nacepili vzorce iz vseh treh vzorčnih mest (podperut, kloaka in sapišče), na hranilni agar pa samo vzorce kloak in sapišč. Plošče smo inkubirali 4 – 7 dni pri 30 °C.

3.2.3 Osnovna morfološka karakterizacija bakterijskih kolonij

Vse morfološko različne kolonije, ki so porasle na hranilnem agarju, smo večkrat precepili do čiste kulture in ovrednostili njihove osnovne fenotipske lastnosti: barvo, obliko in rob kolonij. Tako pridobljene izolate smo suspendirali v hranilnem bujonu, ki smo mu dodali 20 % glicerol ter do nadaljnje analize hranili pri -80 °C.

3.2.4 Analiza MALDI-TOF

Analizo MALDI-TOF so za nas opravili na Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano v Mariboru.

3.2.5 Osamitev DNK

Po revitalizaciji izolatov smo iz plošč s čistimi kulturami postrgali biomaso, iz katere smo s pomočjo komercialnih kompletov osamili DNK po navodilih proizvajalca.

3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z metodo PCR smo pomnoževali gene za 16S rRNK in DNK-regijo gena *bla_{OXA-51-like}* za detekcijo bakterije *Acinetobacter baumannii* pri naslednjih pogojih:

- začetna denaturacija DNK: 95 °C 3 min
- 30 ponavljajočih ciklov:
 - 95 °C 30 s (denaturacija DNA)
 - 57 °C (*bla_{OXA-51-like}*)/58 °C (16S rDNK) 30 s (prileganje začetnih oligonukleotidov)
 - 72 °C 90 s (podaljševanje začetnih oligonukleotidov)
- zaključno podaljševanje: 72 °C 7 min

3.2.7 Elektroforeza v agaroznem gelu

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost pomnoževanja v reakciji PCR. Pripravili smo 1 % agarozni gel v pufru TAE. Elektroforezo smo vodili v pufru TAE približno 20 minut pri napetosti 180 V. Po končani elektroforezi smo gel obarvali v raztopini EtBr, ga presvetlili z UV svetlobo nad transiluminatorjem in slikali.

3.2.8 Priprava vzorca za določitev zaporedja 16S rDNK

Pomnožke PCR smo očistili z uporabo komercialnega kompleta (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific) po navodilih proizvajalca. Uspešnost čiščenja smo preverili z agarozno elektroforezo. S pomočjo primerjave med intenziteto pasov očiščenih pomnožkov PCR in velikostnega standarda smo določili približno koncentracijo DNK očiščenih PCR-pomnožkov.

3.2.9 Določanje nukleotidnih zaporedij

Očiščene pomnožke PCR smo sekvencirali pri različnih komercialnih ponudnikih: Microsynth (Avstrija), GATC Biotech AG (Nemčija) in Eurofins Genomics (Nemčija). Vsakemu ponudniku smo poslali raztopino tarčne DNK ustrezne koncentracije, v katero smo dodali želeni začetni oligonukleotid za sekvenciranje.

3.2.10 Analiza nukleotidnih zaporedij

Preiskana nukleotidna zaporedja smo primerjali s homolognimi nukleotidnimi zaporedji shranjenimi v bazah EMBL/GenBank/DDBJ z uporabo programskega orodja BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tistim sevom, katerih nukleotidno zaporedje se je od znanih zaporedij razlikovalo za > 2 %, smo nadalje natančno preiskali nukleotidno zaporedje obeh verig celotnega gena za 16S rRNK. S pomočjo programa ClustalX smo sekvence poravnali. Evolucijske razdalje med sekvencami smo izračunali s Kimurinim dvoparametričnim modelom z algoritmom DNADIST v programskem paketu Phylip. Filogenetska drevesa smo narisali z metodo združevanja sosedov z algoritmom NEIGHBOR v

programskem paketu Phylip in statistično ovrednotili z metodo bootstrap pri 1000 ponovitvah z algoritmom SEQBOOT v programskem paketu Phylip. Filogenetska drevesa smo prikazali s pomočjo programa TreeView.

3.2.11 Statistične metode

Podatke smo obdelali s hierarhično klastersko analizo, ki temelji na združevanju podatkov v skupine ali gruče. Rezultat tega združevanja je dendrogram, iz katerega lahko razberemo povezave med skupinami (Bridges, 1966). Kot algoritem združevanja podatkov v gruče smo uporabili Wardovo metodo (Ward, 1963; Shah s sod., 2011). Za izračun razdalje med gručami smo uporabili evklidsko razdaljo (Dillner s sod., 2005).

Evklidska razdalja:

$$d(p, q) = d(q, p) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (q_i - p_i)^2}$$

Razdalja (d) med dvema točkama (p in q) je dolžina daljice, ki ju povezuje.

Razvozlišča dendrograma smo ovrednotili z metodo "bootstrap", s katero je program 1000krat izrisal dendrogram, vsakič z drugo naključno izbrano skupino podatkov. Številke so prikazane na razvozliščih dendrograma in nam povedo, kolikokrat se je posamezno razvozlišče pojavilo na dotičnem mestu. Preglednice, potrebne za izris dendrograma, smo izpisali v programu Statistica (version 10, StatSoft), dendrograme pa smo izrisali s pomočjo programskega orodja Past (Paleontological Statistics, version 3.10).

Za izračun statistične značilnosti povezav med mikrobioto sapišč ptic in posameznimi skupinami ptic smo uporabili Studentov t-test in Fisherjev test. Izračun smo naredili s programom GraphPad Prism (GraphPad Software, 2006). S Studentovim t-testom smo primerjali bogatost mikrobiote pri različnih skupinah ptic, s Fisherjevim testom pa smo ugotavljali razlike v pogostosti pojavljanja bakterij pri različnih skupinah ptic. Pri obeh testih smo kot statistično značilno povezavo upoštevali vrednost $P < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 OSAMITEV IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ

V raziskavi smo vzorčili 15 različnih vrst ptic. Nekatere vrste ptic smo vzorčili večkrat (preglednica 5). Večina vzorčenih ptic izhaja iz rodu pevcev (Passeriformes), razen golobov, ki pripadajo rodu Columbiformes. Odvzete brise podperuti smo cepili na selektivno gojišče CHROMagar™ *Acinetobacter*, kloake in sapišča pa tudi na hranilni agar. Prav tako smo iz celokupne DNK, neposredno iz brisa, s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi z metodo PCR iskali bakterijo *Acinetobacter baumannii*. Te bakterije nismo osamili na gojiščih, niti identificirali z metodo PCR. V nadaljevanju smo zaradi prevelikega števila izolatov identificirali le tiste, ki smo jih osamili iz sapišč. Tako smo se odločili zato, ker so po literaturnih podatkih sapišča ptic v primerjavi s kloako slabše raziskana.

Preglednica 5: Seznam vzorčenih ptičev s povprečnim številom poraslih in morfološko različnih bakterijskih kolonij iz sapišč.

Vrsta ptiča	Osebek	Število kolonij	Aritmetična sredina	Standardni odklon
golob (<i>C. livia</i>)	golob 1	7	3,25	± 2,28
	golob 3	1		
	golob 4	3		
	golob 5	2		
trstni strnad (<i>E. schoeniclus</i>)	AZ98041	3	3,00	
rumeni strnad (<i>E. citrinella</i>)	AZ98042	4	4,00	
lišček (<i>C. carduelis</i>)	AZ97063	2	2,00	
ščinkavec (<i>F. coelebs</i>)	AZ97074	10	10,00	
plavček (<i>P. caeruleus</i>)	AZ98062	2	2,00	
poljski vrabec (<i>P. montanus</i>)	AZ97064	7	5,67	± 1,89
	AZ97065	7		
	AZ97943	3		
siva pevka (<i>P. modularis</i>)	AZ97048	4	2,50	± 1.12
	AZ97049	2		
	AZ97050	3		
	AZ98060	1		
črnoglavka (<i>S. atricapilla</i>)	AZ95994	1	2,50	± 1,50
	AZ97059	4		
kovaček (<i>P. trochulus</i>)	KT59201	1	1,00	
vrnja listnica (<i>P. collybita</i>)	KT59202	3	3,00	
vrtna penica (<i>S. borin</i>)	AZ95990	4	4,00	
taščica (<i>E. rubecula</i>)	AZ97908	1	2,75	± 2,05
	AZ97913	1		
	AZ98057	6		
	AZ98058	3		
pogorelček (<i>P. phoenicurus</i>)	AZ95991	5	5,00	
cikovt (<i>T. philomelos</i>)	E830205	12	12,00	
skupaj		102	3,78	

4.1.1 Morfološka karakterizacija bakterij

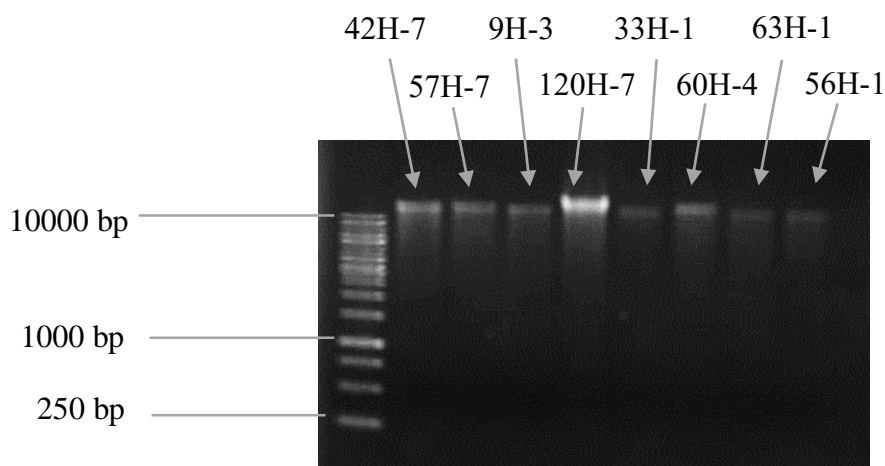
Osamljenim bakterijskim kolonijam smo določili obliko, profil in barvo, si zapisali morebitna druga opažanja ter jih poskušali združiti v skupine morfološko podobnih izolatov (priloga 1).

4.1.2 Analiza MALDI-TOF

Z analizo MALDI-TOF smo najprej poskušali identificirati 20 izolatov, a smo z gotovostjo lahko določili le *Acinetobacter calcoaceticus* (36H-1) in *Pseudomonas aeruginosa* (123H), saj bazo znanih profilov MALDI-TOF sestavljajo večinoma klinično pomembne bakterijske skupine, naši izolati pa so bili okoljski, zato teh vrst bakterij v uporabljeni bazi ni bilo na razpolago za primerjavo. Odločili smo se, da bomo pridobljene izolate identificirali na osnovi nukleotidnega zaporedja genov za 16S rRNK.

4.1.3 Osamitev DNK

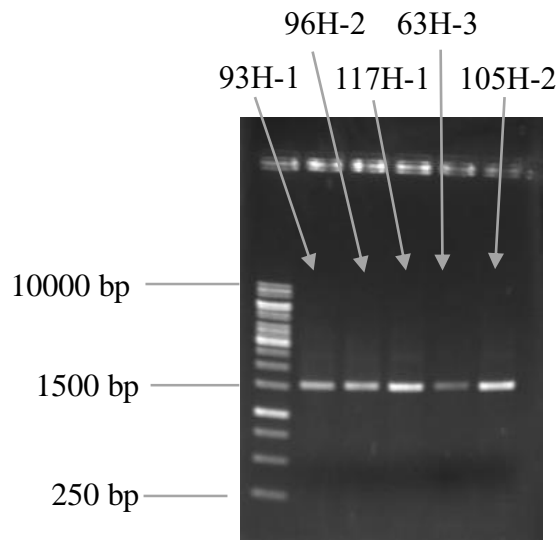
DNK smo uspešno osamili iz 102 bakterijskih izolatov. Uspešnost smo preverili z gelsko elektroforezo. Primer slike uspešne osamitve DNK je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Primer slike elektroforeznega gela po preverjanju uspešnosti osamitve DNK. V prvem stolpcu je velikostni standard DNK, zatem si sledijo vzorci kot navedeno nad sliko.

4.1.4 Pomnoževanje genov za 16S rRNK

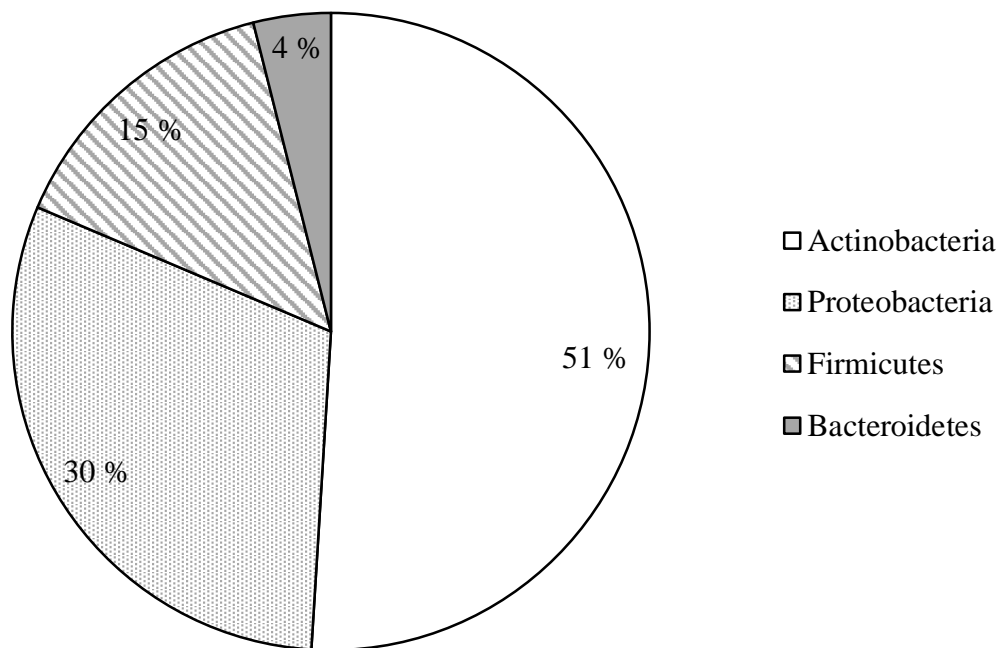
Vsem izolatom, ki smo jim uspešno osamili DNK, smo pomnožili gen za 16S rRNK (slika 4), ga očistili in poslali na sekvenciranje.



Slika 4: Primer slike elektroforeznega gela po čiščenju produktov PCR. Na prvi progi je velikostni standard DNK, nato sledijo vzorci, kot navedeno nad sliko.

4.1.5 Identifikacija izolatov

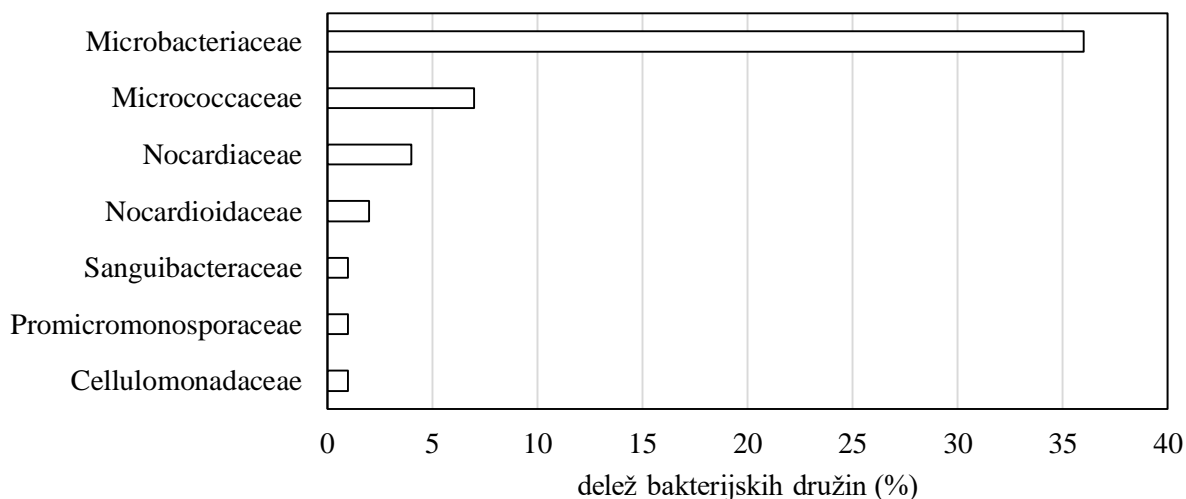
Po sekvenciranju in primerjanju naših nukleotidnih zaporedij s homolognimi zaporedji v mednarodnih referenčnih bazah, smo lahko do vrste natančno določili 84 izolatov, ostale smo lahko določili le do rodu natančno. Osamili smo tudi tri potencialno nove vrste: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 in *Chryseobacterium* sp. 60H-4. Seznam vseh izolatov z njihovim izvorom in identifikacijo je prikazan v prilogi 1. Izolati so bili uvrščeni v 69 različnih vrst, kar predstavlja 22 različnih družin in štiri različna bakterijska debla (slika 5).



Slika 5: Delež posameznih bakterijskih debel, osamljenih iz sapišč ptičev.

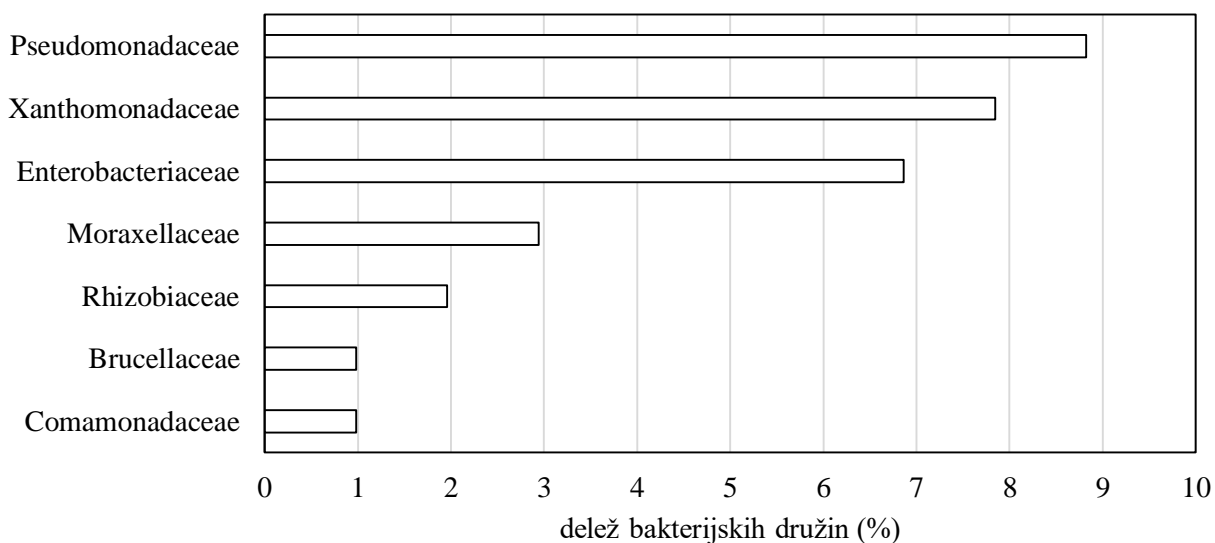
Po pregledu literature smo ugotovili, da je 13 (tj. 18,8 %) identificiranih vrst bakterij oportunističnih za človeka (preglednica 11), pri čemer nismo upoštevali izolatov, ki smo ju uvrstili v rodova *Micrococcus* sp. in *Oerskovia* sp., ker ju nismo določili do vrste natančno. Več vrst iz obeh navedenih rodov je znanih po potencialni patogenosti (Rihs s sod., 1990; Harrington s sod., 1996; Georgiev, 2003; Oudiz s sod., 2004; Valdivia-Arenas in Sood, 2008). Osamili smo tudi sedem (tj. 10,1 %) vrst, ki so oportunistične za rastline (preglednica 12). Izmed omenjenih vrst so štiri takšne, ki lahko predstavljajo nevarnost za človeka in rastline.

Od vseh 102 izolatov smo iz debla Actinobacteria osamili samo predstavnike reda *Actinomycetales*. Od tega je največ izolatov pripadalo družini Microbateriaceae (35,3 %), izolirali pa smo tudi predstavnike Micrococcaceae (6,9 %), Nocardiaceae (3,9 %), Nocardiodaceae (2 %) in po enega predstavnika iz Promicromonosporaceae (1 %), Sanguibacteraceae (1 %) ter Cellulomonadaceae (1 %) (slika 6).



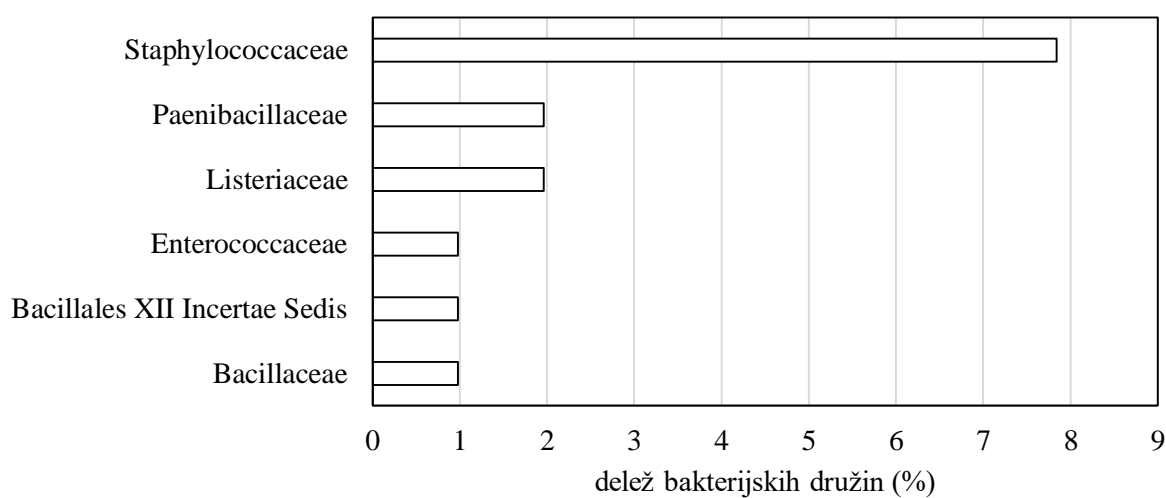
Slika 6: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Actinobacteria v mikrobioti sapišč.

Izolati iz debla *Proteobacteria* so pripadali petim redovom: *Pseudomonadales*, *Xanthomonadales*, *Enterobacteriales*, *Rhizobiales*, *Burkholderiales* oz. sedmim družinam, od tega največ *Pseudomonadaceae* (8,8 %), *Xanthomonadaceae* (7,8 %), *Enterobacteriaceae* (6,9 %), nekoliko manj jih je pripadalo družinam *Moraxellaceae* (2,9 %), *Rhizobiaceae* (2 %); družini *Comamonadaceae* (1 %) in *Brucellaceae* (1 %) pa sta bili zastopani s po le enim predstavnikom (slika 7).



Slika 7: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla *Proteobacteria* v mikrobioti sapišč.

Deblu Firmicutes je pripadalo največ predstavnikov redu *Bacillales*, en izolat pa je pripadal redu *Lactobacilliales*. Najštevilčnejša družina, ki je pripadala redu *Bacillales*, je bila družina *Staphylococcaceae* (7,8 %), po dva izolata sta pripadala družinam *Listeriaceae* (2 %) in *Paenibacillaceae* (2 %) ter po en izolat družinam *Bacillaceae* (1 %) in *Bacillales XII Incertae Sedis* (1 %). Vrsta *Enterococcus plantarum* je bila edini predstavnik redu *Lactobacilliales* oz. družine *Enterococcaceae* (1 %) (slika 8).



Slika 8: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Firmicutes v mikrobioti sapišč.

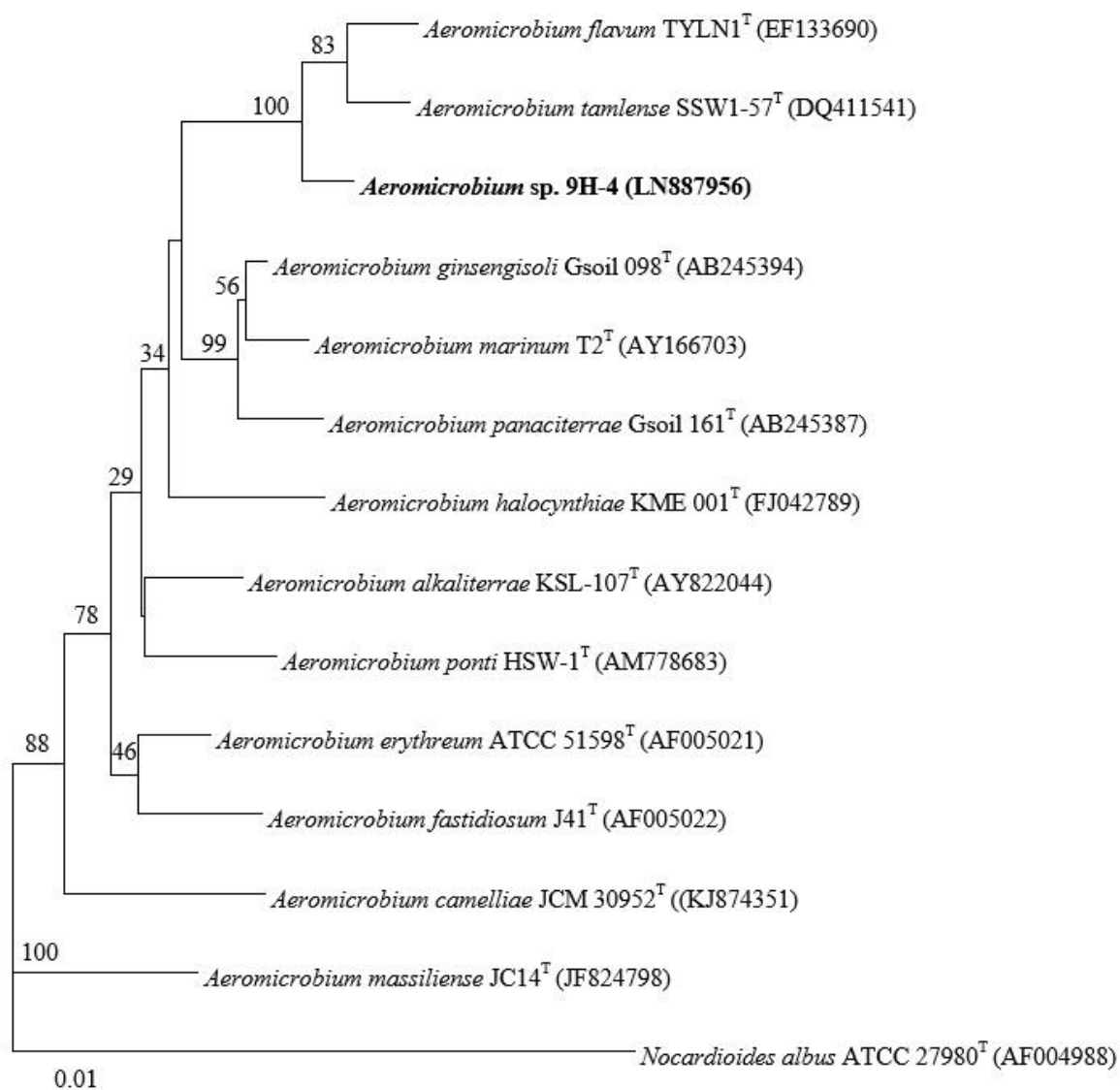
Deblu Bacteroidetes so pripadali štiri izolati. Trije so spadali v red *Flavobacteriales* oz. družino *Flavobacteriaceae* (2,9 %), en izolat pa v red *Sphingobacteriales* oz. družino *Sphingobacteriaceae* (1 %) (slika 9).



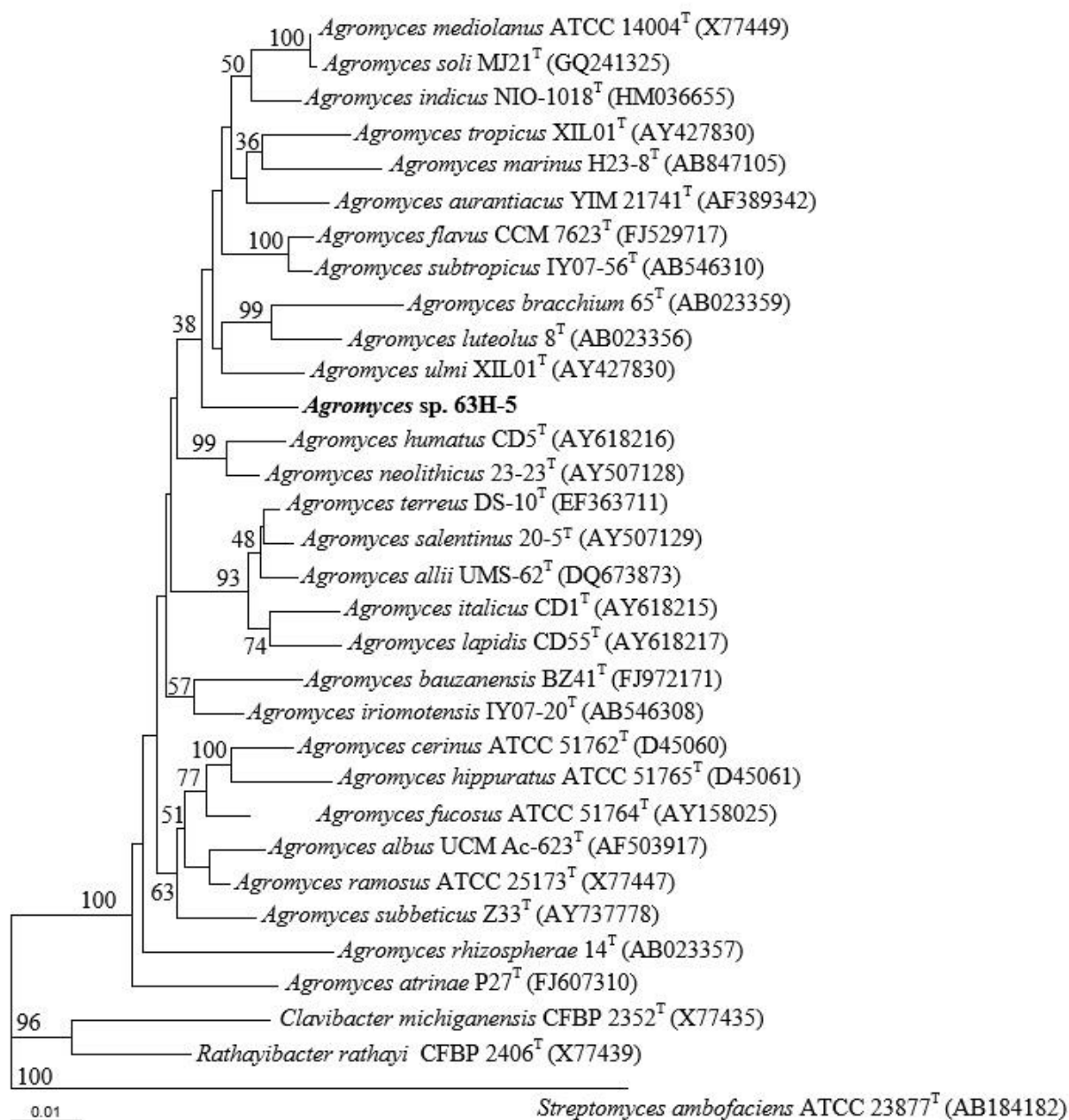
Slika 9: Delež posameznih bakterijskih družin iz debla Bacteroidetes v mikrobioti sapišč.

Pri treh od 102 izolatih (tj. 2,9 %) se je nukleotidno zaporedje 16S rDNK dovolj razlikovalo od najbližjih sorodnikov (več kot 2 %), da smo jih identificirali kot potencialno nove vrste: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 in *Chryseobacterium* sp. 60H-4. *Aeromicrobium* sp. 9H-4 smo izolirali iz vrtnice (št. obročka AZ95990), vzorčene 18. 9.

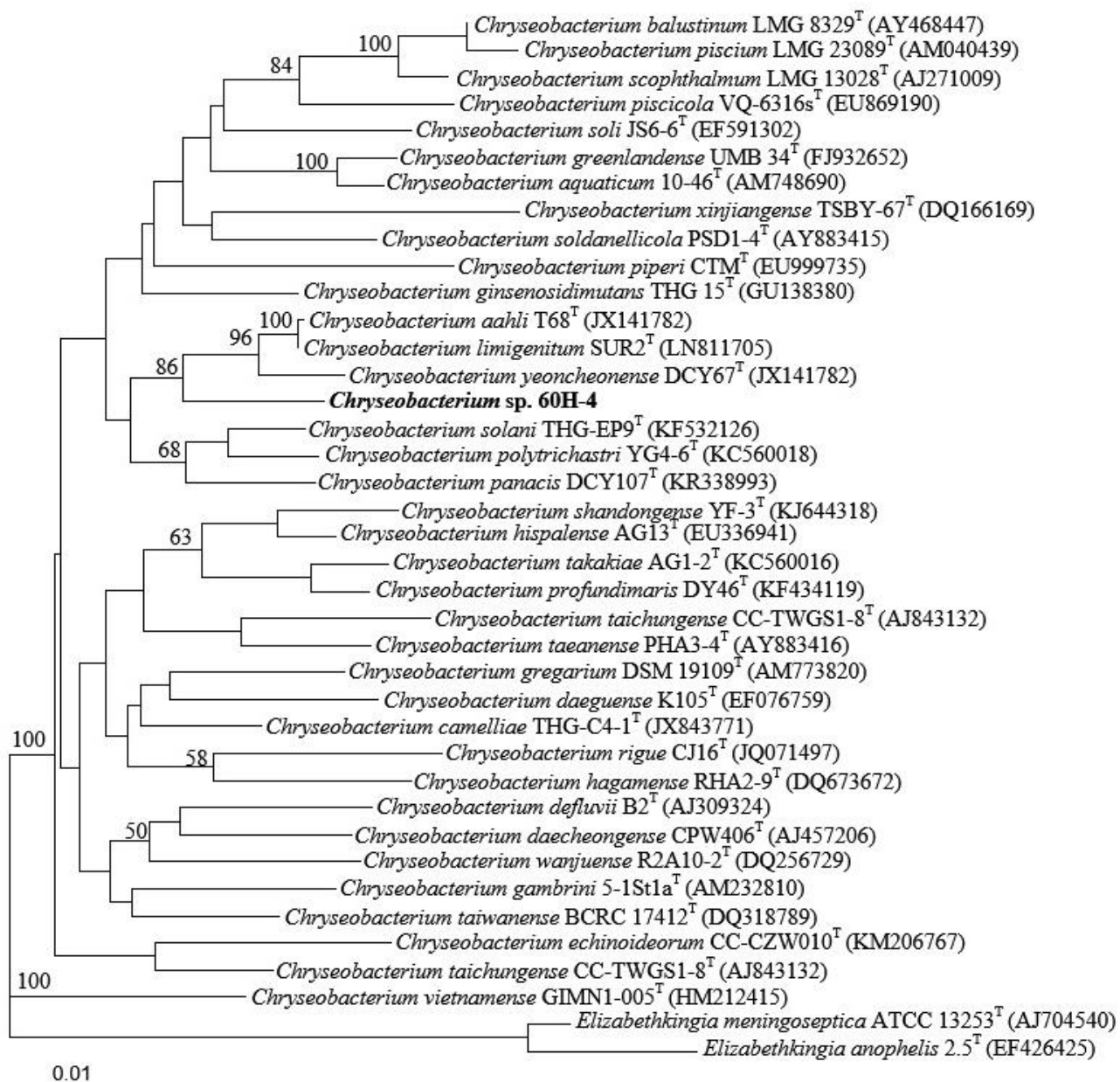
2013 na Pragerskem. *Agromyces* sp. 63H-5 smo izolirali iz cikovta (št. obročka E830205), ki smo ga ujeli 4. 10. 2013 na Pragerskem. *Chryseobacterium* sp. 60H-4 smo izolirali iz poljskega vrabca (št. obročka AZ37065), ki smo ga ujeli 4. 10. 2013 prav tako na Pragerskem. Filogenetska analiza, narejena na osnovi primerjav genov za 16S rRNK potencialno novih bakterijskih vrst *Agromyces* sp., *Aeromicrobium* sp. in *Chryseobacterium* sp. je prikazana na slikah 10, 11 in 12.



Slika 10: Filogenetska uvrstitev izolata *Aeromicrobium* sp. 9H-4 med druge tipske vrste iz rodu *Aeromicrobium*. V oklepajih so navedene zaporedne številke nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNK, pod katerimi so te sekvence dostopne v bazah EMBL/DDBJ/GenBank. Daljica prikazuje merilo za 1 % razlik v nukleotidnih zaporedjih.



Slika 11: Filogenetska uvrstitev izolata *Agromyces sp. 63H-5* med druge tipske vrste iz rodu *Agromyces*. V oklepajih so navedene zaporedne številke nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNK, pod katerimi so te sekvence dostopne v bazah EMBL/DDBJ/GenBank. Daljica prikazuje merilo za 1 % razlik v nukleotidnih zaporedjih.



Slika 12: Filogenetska uvrstitev izolata *Chryseobacterium* sp. 60H-4 med druge tipske vrste iz rodu *Chryseobacterium*. V oklepajih so navedene zaporedne številke nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNK, pod katerimi so te sekvence dostopne v bazah EMBL/DDBJ/GenBank. Daljica prikazuje merilo za 1 % razlik v nukleotidnih zaporedjih.

4.2 ISKANJE POVEZAV MED VRSTAMI BAKTERIJ IN VRSTAMI PTIČEV

K podatkom o vzorčenih ptičih smo dopisali družino ter dodali nekatere ekološke lastnosti: način prehranjevanja, mesto nabiranja hrane, status selivke/stalnice/klateža, vrsto bivališča, ter ali so združeni v jate (preglednica 6).

Preglednica 6: Seznam družin vzorčenih ptičev z nekaterimi njihovimi ekološkimi lastnostmi.

Ptič	Družina	Prehrana	Nabiranje	Status	Bivališče	Združeni v skupine/ jate
golob	Columbidae	semena/plodovi	na tleh	stalnica	urbano	da
trstni strnad	Emberizidae	žuželke	na zeliščih	klatež	močvirna vegetacija	ne
rumeni strnad	Emberizidae	žuželke	na tleh	selivka	gozdni rob	ne
lišček	Fringillidae	semena	na zeliščih	klatež	travišča	da
ščinkavec	Fringillidae	semena/žuželke	na drevju	stalnica	gozd	ne
plavček	Paridae	semena/žuželke	na drevju	stalnica	gozd	ne
poljski vrabec	Passeridae	semena/žuželke	na tleh	stalnica	podeželje	da
siva pevka	Prunellidae	žuželke	na drevju	selivka	gozd	ne
črnoglavka	Sylviidae	žuželke	na drevju	selivka	gozd	ne
kovaček	Sylviidae	žuželke	na drevju	selivka	grmišče	ne
vrnja listnica	Sylviidae	žuželke	na drevju	selivka	gozd	ne
vrtna penica	Sylviidae	žuželke	na drevju	selivka	grmišče	ne
taščica	Turdidae	žuželke	na tleh	klatež	gozd	ne
pogorelček	Turdidae	žuželke	na tleh	selivka	podeželje	ne
cikovt	Turdidae	žuželke/polži	na tleh	selivka	gozd	ne

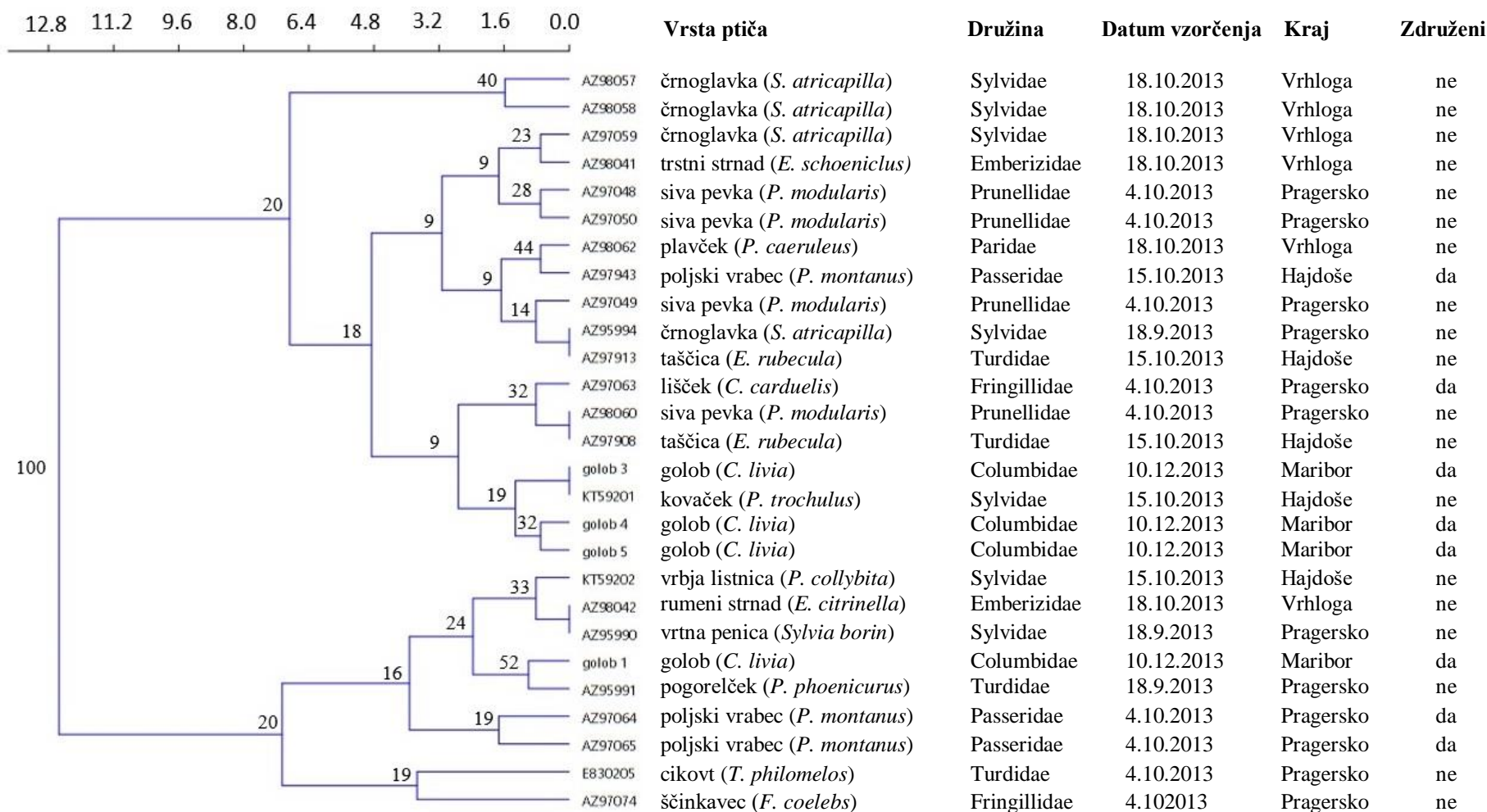
Mikrobiota sapišč se je razlikovala med obema skupinama (žužkojedi in vsejedi/sadjejadi) v vrstni pestrosti in tudi v sestavi mikrobiote. Večino izolatov smo našli v eni izmed dveh skupin (30 – žužkojedi, 28 – vsejedi in sadjejadi), samo 10 vrst je koloniziralo sapišča ptic, ki so pripadale obema skupinama (preglednica 7).

Preglednica 7: Seznam vrst, osamljenih iz sapišč prostoživečih ptic, ločenih po skupinah glede na način prehranjevanja ptiča.

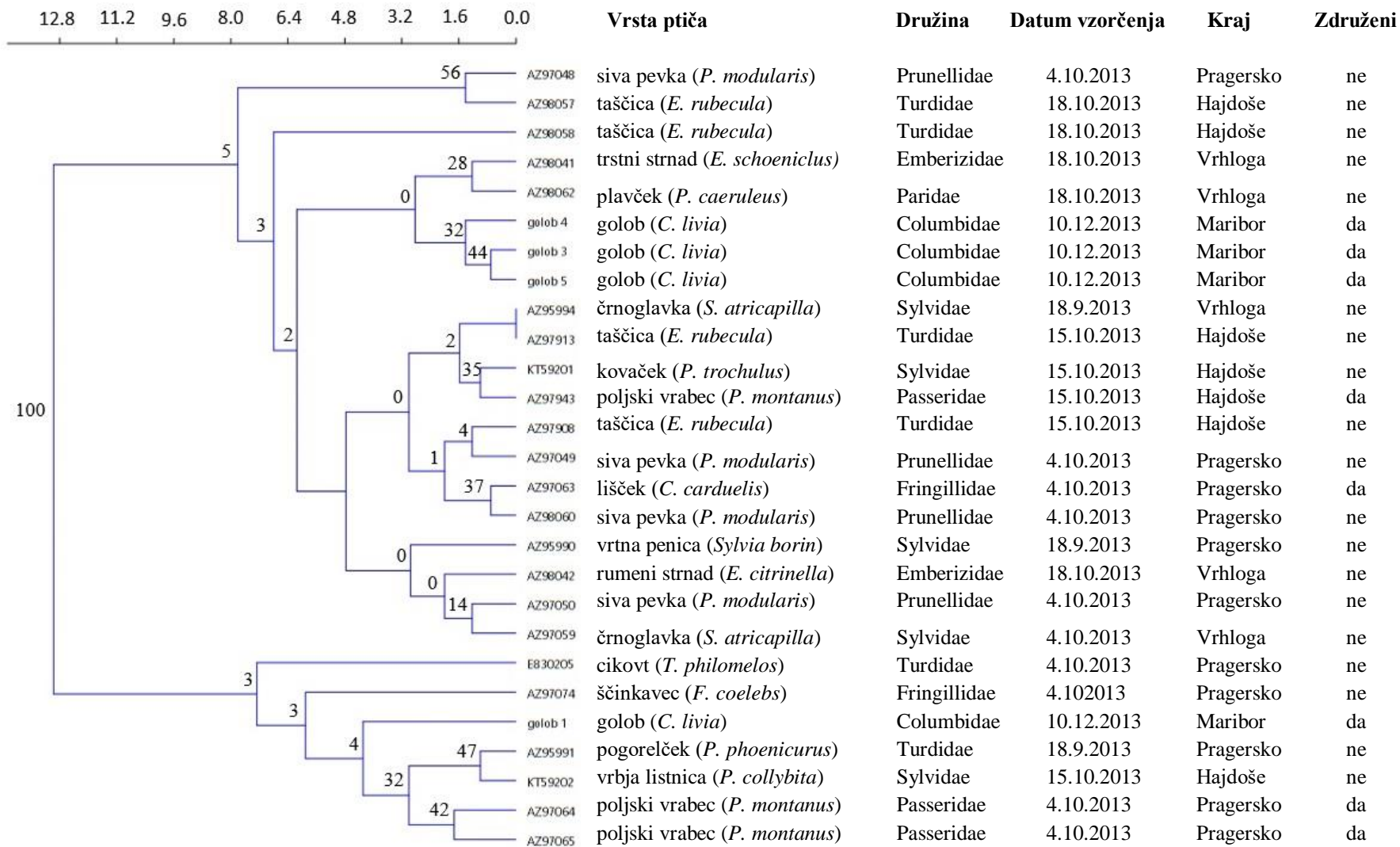
Vsejedi/sadjejedi	Žužkojedi	Obe skupini ptic
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Aeromicrobium ponti</i> ali <i>Aeromicrobium tamense</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	<i>Aeromicrobium</i> sp. nov.*	<i>Frigoribacterium faeni</i>
<i>Agromyces</i> sp. nov.**	<i>Agrococcus versicolor</i>	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> ali <i>M. phyllosphaerae</i>
<i>Agromyces terreus</i>	<i>Agromyces allii</i>	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
<i>Arthrobacter aurescens</i>	<i>Bacillus aryabhatai</i>	<i>Micrococcus yunnanensis</i>
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> ali <i>A. aurescens</i>	<i>Citrobacter gilleni</i>	<i>Paenibacillus xylanexedens/amylolyticus/tundra</i>
<i>Arthrobacter oxydans</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Brochothrix campestris</i>	<i>Curtobacterium plantarum</i>	<i>Rathayibacter festucae</i>
<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	<i>Enterococcus plantarum</i>	<i>Rhodococcus fascians</i>
<i>Chryseobacterium daecheongense</i>	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	<i>Microbacterium hominis</i>	
<i>Chryseobacterium</i> sp. nov.***	<i>Microbacterium oleivorans</i>	
<i>Curtobacterium citreum</i>	<i>Microbacterium oxydans</i>	
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Microbacterium</i> sp.	
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	<i>Microbacterium xylanilyticum</i>	
<i>Leucobacter exalbidus</i>	<i>Ochrobactrum thiophenivorans</i>	
<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	<i>Pantoea anthophila</i>	
<i>Microbacterium resistens</i>	<i>Plantibacter flavus</i>	
<i>Microbacterium testaceum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	
<i>Oerskovia</i> sp.	<i>Pseudomonas orientalis</i>	
<i>Okibacterium fritillariae</i>	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	
<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Pseudomonas cedrina</i>	<i>Sanguibacter keddiei</i>	
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	<i>Serratia grimesii</i>	
<i>Pseudomonas flavescens</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
<i>Pseudoxanthomonas koreensis</i>	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	
<i>Sphingobacterium faecium</i>	<i>Variovorax paradoxus</i>	
<i>Staphylococcus gallinarum</i>		
<i>Staphylococcus</i> sp.		

Legenda: *, vir izolacije je vrtna penica (*Sylvia borin*); **, vir izolacije je cikovt (*Thurdus philomelos*); ***, vir izolacije je poljski vrabec (*Passer montanus*)***

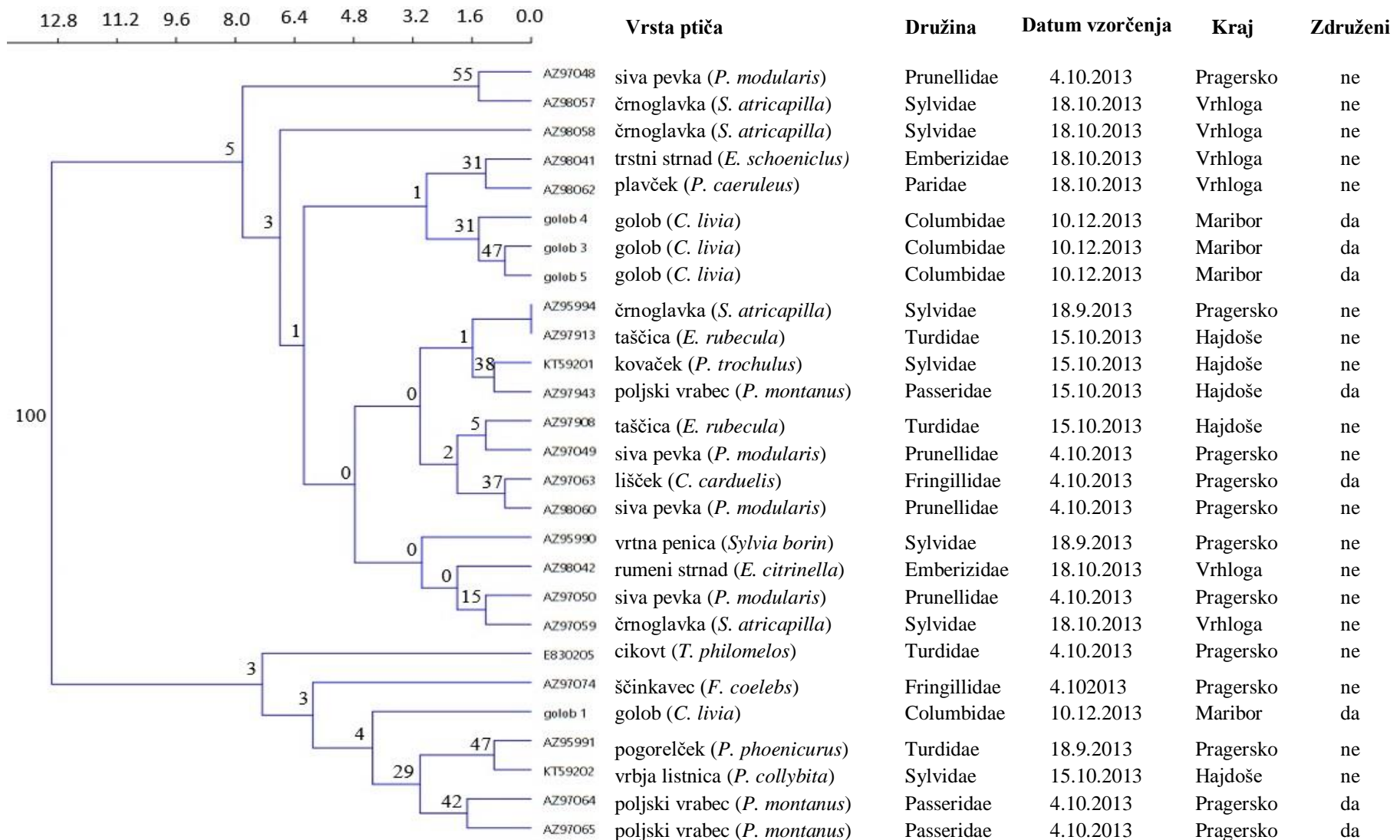
Z metodo hierarhičnega združevanja smo na osnovi sestave mikrobiote sapišč, ptice združevali v gruče oz. klastre in jih prikazali v dendrogramih (slike 13 - 18). Med gručami smo iskali statistično značilne razlike. Mikrobioto sapišč smo združevali na nivoju debela, reda in družine bakterij. Združevanje na nivoju vrst bakterij ni bilo smiselno zaradi relativno majhnega števila vzorčenih ptic. Slike 13 - 15 prikazujejo združevanje ptic na osnovi posameznega osebka, slike 16 - 18 na osnovi vrste ptic. Dendrogramom smo dodali še nekatere druge lastnosti vzorčenih ptic, kot so datum vzorčenja, morebitno življenje v skupinah (jatah), vrsto prehrane, mesto nabiranja hrane in ali je ptič selivka, klatež ali stalnica.



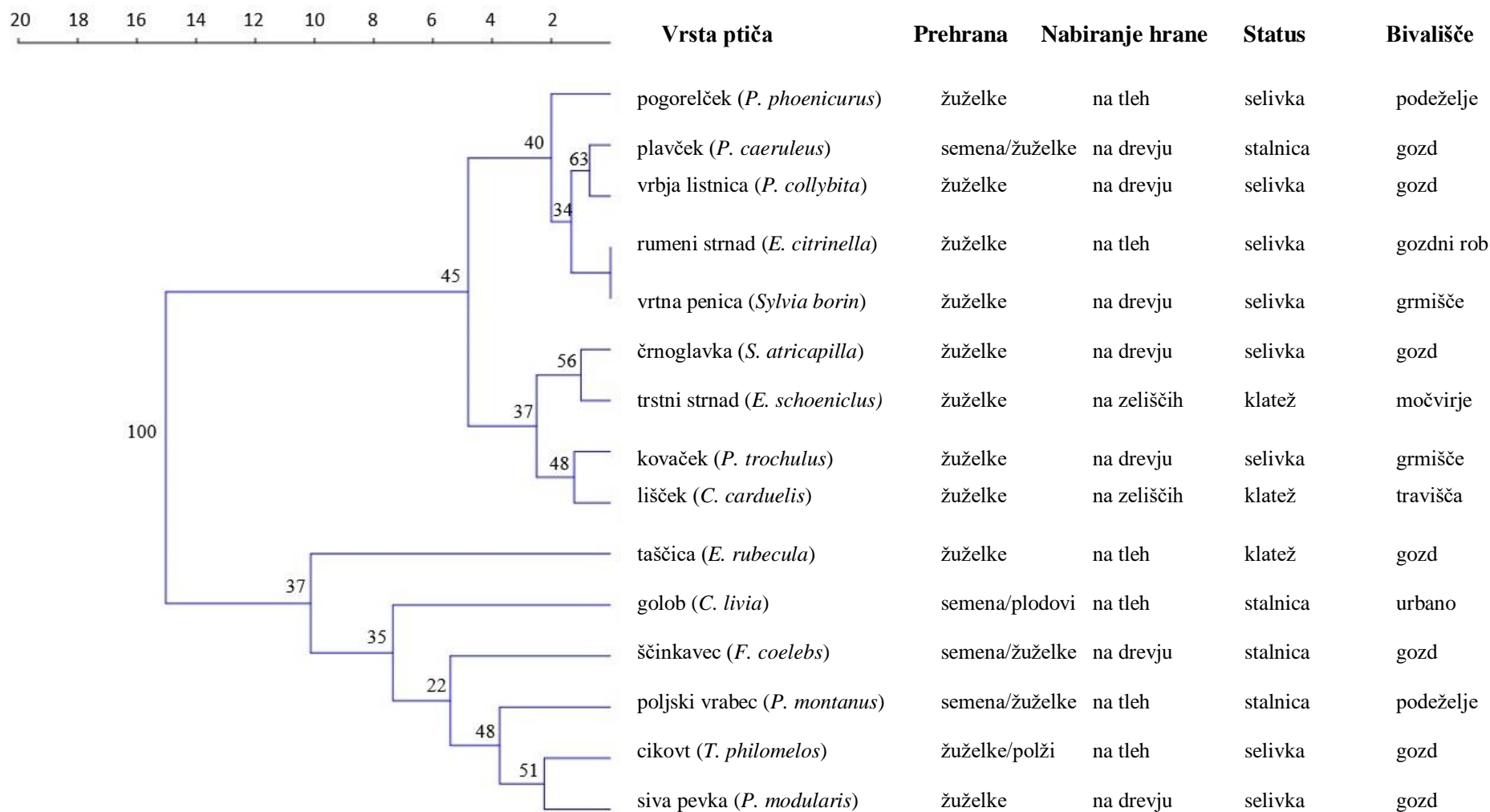
Slika 13: Osebkni grupirani na podlagi skupnega bakterijskega debla v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo na osi je podatek o Evklidski razdalji. Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev). Pod stolpcem »združeni« je podatek, ali se ptiči združujejo v jate (da) oz. se ne (ne).



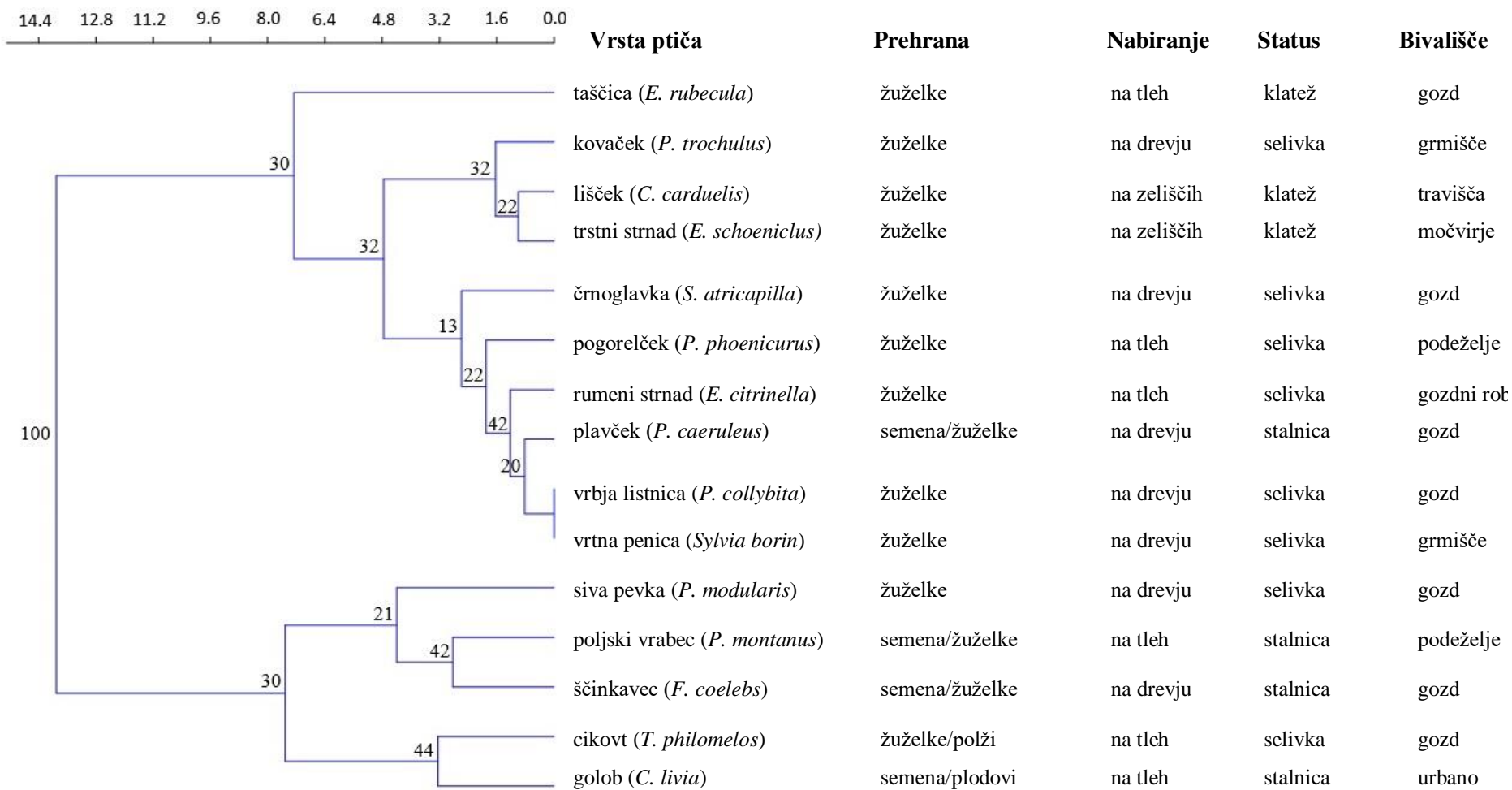
Slika 14: Osebkni grupirani na podlagi skupnega bakterijskega reda v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo je podatek o Evklidski razdalji (distance). Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev). Pod stolpcem »združeni« je podatek, ali se ptiči združujejo v jate (da) oz. se ne (ne).



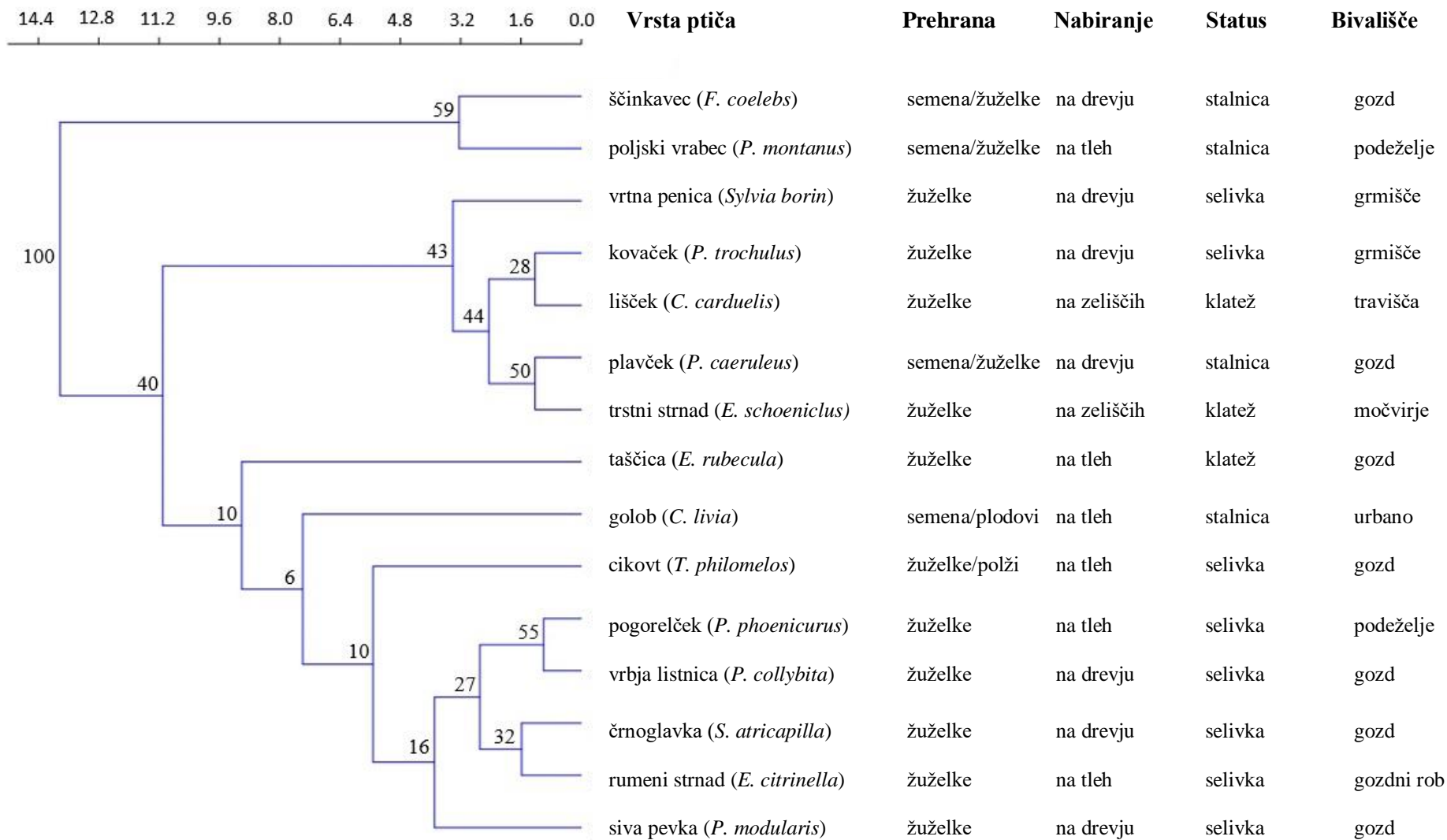
Slika 15: Osebki grupirani na podlagi skupnih bakterijskih družin v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo je podatek o Evklidski razdalji (distance). Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev). Pod stolpcem »združeni« je podatek, ali se ptiči združujejo v jate (da) oz. se ne (ne).



Slika 16: Vrste ptic grupirane na podlagi skupnega bakterijskega debla v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo je podatek o Evklidski razdalji. Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev).



Slika 17: Vrste ptic grupirane na podlagi skupnega bakterijskega reda v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo je podatek o Evklidski razdalji. Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev).



Slika 18: Vrste ptic grupirane na podlagi skupne bakterijske družine v kultivabilni mikrobioti sapišč. Zgoraj levo je podatek o Evklidski razdalji. Pri razvejiščih je navedeno število bootstrap (1000 ponovitev).

4.2.1 Studentov t-test

S hierarhičnim združevanjem smo ugotovili, da se vrste ptic večinoma grupirajo glede na način prehranjevanja (slike 16, 17 in 18). Vrste ptic smo razdelili v skupine glede na njihovo prehrano in vrstno bogatost njihove bakterijske mikrobiote statistično ovrednostili s Studentovim t-testom. Statistično značilno razliko ($P = 0,0204$) smo ugotovili, ko smo primerjali vrste ptic, ki se hranijo samo z žuželkami in tiste z mešano prehrano (žuželke/polži, žuželke/semena).

4.2.2 Fisherjev test

Pri Fisherjevem testu smo primerjali prisotnost/odsotnost posameznih družin bakterij pri skupinah ptic glede na njihovo prehrano. Ugotovili smo, da je večja verjetnost, da bomo na brisih iz golobov našli vrsto *S. gallinarum* v primerjavi z drugimi vzorčenimi pticami (Fisherjev test ($P=0.0001$)) (preglednica 8). Tudi prisotnost rodu *Staphylococcus* sp. je bila pogostejša pri ptičih, ki se hranijo s plodovi oz. semeni kot pri ptičih, ki se hranijo samo z žuželkami ali žuželkami in polži/semeni (Fisherjev test ($P=0.030$)) (preglednica 9). Ugotovili smo tudi značilno razliko pri ptičih, ki se hranijo samo s plodovi (v našem primeru so to bili golobi) in ostalimi ptiči (Fisherjev test ($P=0.0128$)) (preglednica 10).

Preglednica 8: Kontingenčne preglednice za računanje Fisherjevega testa za vrsto *S. gallinarum* med golobi in ostalimi ptiči.

	Prisotne	Odsotne	Skupaj	Vrednost p
Golobi	4	0	4	0.0001
Ostali	0	23	23	
Skupaj	4	22	27	

Preglednica 9: Kontingenčne preglednice za računanje Fisherjevega testa za družino Staphylococcaceae med ptiči, ki jedo plodove in semena ter ptiči, ki se hranijo samo z žuželkami ali žuželkami in polži/semeni.

	Prisotne	Odsotne	Skupaj	Vrednost p
Plodovi, semena	3	2	5	0.0300
Žuželke, žuželke/semena, žuželke/polži	2	20	22	
Skupaj	5	22	27	

Preglednica 10: Kontingenčna preglednica za računanje Fisherjevega testa za družino Staphylococcaceae med ptiči, ki jedo plodove in ostalimi ptiči.

	Prisotne	Odsotne	Skupaj	Vrednost p
Plodovi	3	1	4	0.0128
Ostali	2	21	23	
Skupaj	5	22	27	

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V nalogi smo ugotavljali prisotnost bakterije *Acinetobacter baumannii* v izbranih vrstah prostoživečih ptic. Bakterija *A. baumannii* je pogojno patogena za človeka, povzroča sepso, meningitis, pljučnico, okužbe ran in okužbo sečevoda pri pacientih z oslabljenim imunskim sistemom (Joshi in Litake, 2013). Zaradi tvorbe biofilma in odpornosti proti številnim antibiotikom je zdravljenje bolnikov, okuženih s to bakterijo, otežkočeno (Guardabassi s sod. 1999; Yeom s sod., 2013). Bakterija *A. baumannii* je bila do sedaj izolirana iz različnih okolij, kot so površina človeka, živali, prst, voda, površina različne bolnišnične opreme in ptičjega fecesa (Dahiru in Enabulele, 2015; Joshi in Litake, 2013; Xin sod., 2014). Z nacepivitvijo brisov, odvzetih izpod peruti, iz sapišč in iz kloake 27 prostoživečih ptic na selektivno gojišče CROMagar *Acinetobacter*, kot tudi z neposrednim preiskovanjem brisov z metodo PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za *A. baumannii*, v naši raziskavi bakterije *A. baumannii* v preiskanih pticah nismo identificirali.

Poleg analize prisotnosti bakterije *A. baumannii* smo iz odvzetih vzorcev preiskali tudi celokupno kultivabilno mikrobioto sapišč. Tako smo iz 27 prostoživečih ptic osamili 102 morfološko različni koloniji. Kot je prikazano v preglednici 5, se je število morfološko različnih kolonij pri posameznih pticah gibalo od ena do 12. Večina izolatov je pripadala debloma Actinobacteria (51 %) in Proteobacteria (30 %), manjši delež debloma Firmicutes (15 %) in Bacteroidetes (4 %). Mikrobiota sapišč žužkojedov je bila v primerjavi z vsejedi revnejša v smislu vrstne pestrosti, razlikovali pa sta se tudi v vrstni sestavi.

Ker je sapišče ptic slabo raziskana okoljska niša, smo med izolati pričakovali tudi nove, še neopisane bakterijske vrste. Med 102 izolati smo identificirali tri potencialno nove vrste bakterij, ki so bile vse osamljene iz ptičev, vzorčenih na Pragerskem. Potencialno nove vrste so bile uvrščene v rod *Aeromicrobium*, *Agromyces* in *Chryseobacterium*. V filogenetskih drevesih so vsi ti izolati dobro ločeni od svojih najbližjih sorodnih vrst (slike 10, 11, 12). Za opis teh potencialno novih vrst je potrebno natančno preiskati njihove fenotipske in genotipske lastnosti in ugotoviti, če zadoščajo kriterijem za opis novih bakterijskih vrst.

V predhodnih raziskavah je Lamberski s sod. (2003) preiskal mikrobioto sapišč mesojedih ptic, rdečerepe kanje (*Buteo jamaicensis*) in Cooperjevega kragulja (*Accipiter cooperii*) ter z izjemo dveh rodov, *Bacillus* in *Staphylococcus*, odkril drugačno mikrobno sestavo, kot smo jo identificirali v naši raziskavi. To bi lahko pojasnili s tem, da so vzorčili druge vrste ptic, za katere je značilna drugačna prehrana, in katere so izvirale iz drugega geografskega področja (ZDA). Pred kratkim objavljeni rezultati raziskave Stenkata s sod. (2014), v kateri so preiskali grla 167 predstavnikov šestih vrst prostoživečih ptic v Nemčiji, so z gojenjem mikrobioloških brisov na specifičnih gojiščih in identifikacijo izolatov s klasičnimi biokemijskimi testi odkrili predstavnike naslednjih družin: Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Aeromonadaceae, Moraxellaceae, Flavobacteriaceae, Bacillaceae, Staphylococcaceae in Streptococcaceae. Predstavnike vseh družin, razen Aeromonadaceae in Streptococcaceae smo identificirali tudi v naši raziskavi. Stenkata s sod. (2014) so obe družini našli pri pticah, ki se hranijo predvsem z ribami (kormorani, mokovži) oz. živijo na vodi (labod grbec), te vrste ptic pa v naši raziskavi nismo vzorčili.

V sapiščih ptic so bile prisotne različne vrste bakterij, nobena izmed ptic pa ni kazala vidnih bolezenskih znakov. Kljub temu smo v objavljenih člankih poiskali podatke o tem, katere izmed bakterijskih vrst, identificiranih v tem delu, bi lahko bile patogene za ljudi oz. živali in rastline. Med njimi je bilo 13 vrst takšnih, ki so oportunistične za človeka (preglednica 11) in sedem takšnih, ki so oportunistične za rastline (preglednica 12). Tri izmed teh vrst predstavljajo nevarnost tako za človeka kot za rastline.

Preglednica 11: Seznam za človeka oportunističnih vrst bakterij, ki smo jih izolirali iz sapišč ptic.

Vrsta bakterije	Število izolatov	Vir
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	3	Nonaka s sod., 2014
<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1	Petkar s sod., 2011
<i>Curtobacterium citreum</i>	1	Rivera s sod., 2012
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1	Francis s sod., 2011
<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	1	Tena s sod., 2014
<i>Hafnia alvei</i>	1	Günthard in Pennekamp, 1996
<i>Microbacterium oleivorans</i>	2	Kim in Lee, 2012
<i>Microbacterium resistens</i>	1	Panackal, 2013
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	Rezzonico s sod., 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Yamazaki s sod., 2011
<i>Serratia grimesii</i> (v kompleksu z drugimi bakterijami)	1	Kumar s sod., 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	Vuong in Otto, 2002
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	1	Tibra s sod., 2010

Preglednica 12: Seznam potencialno fitopatogenih vrst bakterij, ki smo jih izolirali iz sapišč ptic.

Vrsta bakterije	Število izolatov	Vir
<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	2	Bouzar in Jones, 2001
<i>Clavibacter michiganensis</i>	1	Xu s sod., 2010
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	1	Francis s sod., 2011
<i>Pantoea agglomerans</i>	2	Rezzonico s sod., 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	Yamazaki s sod., 2011
<i>Pseudomonas flavescens</i>	1	Fett s sod., 1996
<i>Rhodococcus fascians</i>	4	Crespi s sod., 1992

Večino bakterijskih vrst iz preglednic 11 in 12 smo osamili le iz enega ptiča, z izjemo bakterije *Acinetobacter calcoaceticus*, ki smo jo osamili iz goloba, ščinkavca in sive pevke, ter bakterije *Microbacterium oleivorans*, ki smo jo osamili iz pogorelčka in taščice. Iz več kot polovice vzorčenih vrst ptic, tj. osem od 15 smo osamili eno ali več oportunističnih bakterij, nevarnih za človeka. Izmed vzorčenih vrst ptic sta golob in poljski vrabec tisti vrsti, ki živita v bližini človeka, zaradi česar sta potencialni vektor prenosa bakterij na človeka. Iz treh izmed štirih vzorčenih golobov smo osamili bakterijo *Staphylococcus gallinarum*, pri četrtem golobu pa smo osamili vrsto *Acinetobacter calcoaceticus*. Iz sapišč poljskih vrabcev smo osamili naslednje oportunistične bakterije: *Curtobacterium citreum*, *Curtobacterium flaccumfaciens* in *Exiguobacterium sibiricum*.

Iz sapišč 11 od 15 vrst vzorčenih ptic smo osamili sedem vrst oportunističnih bakterij, ki so lahko patogene za rastline. Najpogosteje identificirana vrsta je bila *Rhodococcus fascians*, ki smo jo osamili iz štirih različnih vrst ptic, tj. poljski vrabec, ščinkavec, strnad in siva pevka. Vse štiri vrste ptic imajo tudi različne prehranjevalne navade: poljski vrabec nabira semena/žuželke na drevju, ščinkavec na tleh, rumeni strnad nabira žuželke na tleh, siva pevka na drevju. Sklepamo lahko, da je vrsta *Rhodococcus fascians* splošno razširjena v ptičji populaciji. Zanimiva vrsta, ki smo jo osamili iz črnoglavke je bakterija *Clavibacter michiganensis*, ki povzroča velike ekonomske izgube pri svetovni pridelavi paradižnika (Xu s sod., 2010).

Ko smo statistično ovrednotili prisotnost oz. odsotnost posamezne bakterijske vrste v različnih vrstah ptic, smo ugotovili, da je večja verjetnost, da bomo iz brisov sapišč golobov, v primerjavi z drugimi preiskanimi vrstami ptic, osamili vrsto *S. gallinarum* (preglednica 8). Ugotovili smo tudi, da je prisotnost rodu *Staphylococcus* sp. pogostejša pri ptičih, ki imajo mešano prehrano v primerjavi z žuškojedimi pticami (preglednici 9 in 10).

Prejšnje raziskave so pokazale, da je sestava mikrobiote prebavnega trakta ptičev odvisna od vrste gostitelja in od njegove prehrane (Waite in Taylor, 2014). Ker sta prebavni in respiratorni trakt povezana, lahko domnevamo, da ti dejavniki vplivajo tudi na sestavo mikrobiote respiratornega sistema. Statistična analiza rezultatov naše raziskave je pokazala trend združevanja ptic v dve skupini glede na način prehranjevanja ptic. Ptiči, ki se hranijo le z žuželkami, so pretežno združeni v eno skupino, tisti z mešano prehrano žuželk s semeni in polži ali semeni in plodovi, pa tvorijo drugo skupino (slike 16, 17, 18). Opazimo lahko tudi, da so v eni skupini večinoma ptice, ki hrano nabirajo na drevju, v drugi pa večinoma ptice, ki hrano nabirajo na tleh (slika 16). Prav tako so se selivke in klateži razporedili v eno skupino, stalnice pa v drugo (slika 16). Za natančnejšo analizo in potrditev teh zaključkov bi bilo potrebno preiskati večje število posameznih vrst ptic.

Za ugotavljanje morebitne specifične sestave mikrobiot do nivoja rodov ali celo vrst bakterij v posameznih skupinah ptic, bo potrebno v nadaljevanju preiskati večje število posameznih vrst ptic.

5.2 SKLEPI

- Iz sapišč 27 prostoživečih ptic smo osamili 69 različnih vrst bakterij, med katerimi so prevladovali predstavniki debel Actinobacteria (51 %) in Proteobacteria (30 %).
- Iz sapišč vzorčenih ptic smo osamili tri potencialno nove vrste bakterij: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 in *Chryseobacterium* sp. 60H-4.
- Med izolati iz sapišč prostoživečih ptic smo identificirali tudi oportunistične bakterije, ki lahko povzročajo okužbe pri človeku, živalih in rastlinah.
- Ugotovili smo, da je za sapišča ptic, ki se hranijo samo z žuželkami, v primerjavami s tistimi, ki se hranijo tudi s semeni ali polži značilna manjša bakterijska diverziteteta.
- S statistično obdelavo podatkov smo odkrili domnevno povezavo med prehrano ptičev in sestavo njihove mikrobiote sapišč, ki pa jo je v nadaljevanju potrebno potrditi na večjemu vzorcu ptic.

6 POVZETEK

V nalogi smo proučevali mikrobioto sapišč pri prostoživečih pticah. Ptiči so skupina živali, razširjena po vsem svetu. So potencialni prenašalci patogenih mikroorganizmov in zaradi sposobnosti letenja lahko le-te razširjajo po obsežnem geografskem območju. Zaradi njihove vloge v ekosistemu so mnoge ptice ogrožene. Informacije o diverziteti mikrobiote pri pticah so tako pomembne za preprečevanje širjenja patogenih mikroorganizmov, kot tudi za ohranjanje ogroženih vrst ptic.

Ptice smo vzorčili od septembra do decembra 2013 na treh telesnih območjih: podperut, kloaka in sapišče. Eden od ciljev naloge je bilo tudi ugotavljanje prisotnosti *Acinetobacter baumannii*. Bakterijo *A. baumannii* smo iskali posredno z gojenjem na selektivnem gojišču CHROMagar *Acinetobacter* in neposredno s pomnoževanjem specifičnega gena z metodo PCR. Z nobenim izmed omenjenih pristopov bakterije *A. baumannii* nismo identificirali. V nadaljevanju smo preiskali brise sapišč, vzete 27 pticam, ki so predstavljale 15 različnih vrst. Proučevani ptiči so bili iz rodu pevcev (Passeriformes), razen golobov, ki pripadajo rodu Columbiformes. Brise smo nacepili na kompleksno gojišče NA ter jih gojili 4–7 dni pri temperaturi 30 °C. S pomočjo komercialnih kompletov smo 102 izolatov osamili DNK, pomnožili gene za 16S rRNK ter jim določili nukleotidno zaporedje. Izolati so bili uvrščeni v 69 različnih vrst, kar predstavlja 22 različnih družin in štiri različna bakterijska debla (Actinobacteria 51 %, Proteobacteria 30 %, Firmicutes 15 % in Bacteroidetes 4 %). Izolirali smo tudi tri potencialno nove vrste: *Aeromicrobium* sp. 9H-4, *Agromyces* sp. 63H-5 in *Chryseobacterium* sp. 60H-4. Od identificiranih vrst je bilo 13 (tj. 18,8 %) oportunističnih bakterij za človeka in sedem (tj. 10,1 %) takih, ki so oportunistične za rastline. Izmed omenjenih vrst so tri takšne, ki lahko predstavljajo nevarnost tako za človeka kot za rastline. S pomočjo statističnih orodij (Statistica v10 in Past v3.10) smo iskali povezave med različnimi skupinami ptic in njihovim načinom prehranjevanja, in tudi verjetnostjo pojavljanja posameznih vrst bakterij v posameznih vrstah ptičev. Ugotovili smo, da je za sapišča ptic, ki se hranijo z žuželkami, značilna manjša diverziteta v primerjavi z vsejedimi pticami. Ugotovili smo tudi, da je večja verjetnost, da bomo na brisih iz golobov našli bakterijo *S. gallinarum* v primerjavi z drugimi vzorčenimi pticami (Fisherjev test ($P=0.0001$)), ter da je bila prisotnost rodu *Staphylococcus* sp. pogostejša pri ptičih, ki se hranijo s plodovi oz. semeni v primerjavi s ptiči, ki se hranijo samo z žuželkami ali žuželkami in polži/semeni (Fisherjev test ($P=0.030$)).

Če povzamemo rezultate naše raziskave, lahko ugotovimo, da so med 69 vrstami različnih bakterij prevladovali predstavniki debel Actinobacteria (51 %) in Proteobacteria (30 %), da smo iz sapišč vzorčenih ptic osamili tri potencialno nove vrste bakterij in tudi oportunistične bakterije, ki lahko povzročajo okužbe pri človeku, živalih in rastlinah. Ugotovili smo še domnevno povezavo med prehrano ptičev in sestavo njihove mikrobiote sapišč, kar predstavlja dobro izhodišče za nadaljnje raziskave na večjem vzorcu ptic.

7 ZAHVALA

Zahvalila bi se mentorici, izr. prof. dr. Janji Trček za vso pomoč, usmerjanje in strokovne nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Prav tako bi se rada zahvalila somentorju red. prof. dr. Francu Janžekoviču in asist. dr. Juretu Škrabanu za strokovno pomoč ter vsemu ostalemu strokovnemu osebju na fakulteti.

Za strokovno pomoč in nasvete bi se rada zahvalila tudi gospodu Iztoku Vrešu, ki nas je spremljal na terenu.

Za opravljene analize MALDI-TOF se zahvaljujem red. prof. dr. Maji Rupnik iz Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano v Mariboru.

Posebno zahvalo pa namenjam Mojci, Gregorju, Jasni ter ostalim prijateljem in družini, ki so mi tekom študija pomagali, me vzpodbujali, podpirali in verjeli v moj uspeh.

8 VIRI

- Buck, J. D. (1990). Isolation of *Candida albicans* and halophilic *Vibrio* spp. from aquatic birds in Connecticut and Florida. *Applied Environmental Microbiology* 56: 826-828.
- Baumel, J. J. (1979). *Nomina anatomica avium: an annotated anatomical dictionary of birds.* Academic press, London.
- Bouzart, H. in Jones, J. B. (2001). *Agrobacterium larrymoorei* sp. nov., a pathogen isolated from aerial tumours of *Ficus benjamina*. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1023-1026.
- Bridges, C. C. jr. (1966). Hierarchical cluster analysis. *Psychological Reports* 18: 851-854.
- Cramp, S. s sod. (1998). *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. The birds of the Western Palearctic vol. 1.* Oxford University Press, Oxford, London, New York: 1-35.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A. B., van Montagu, M., Desomer, J. (1992). Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO Journal* 11(3): 795-804.
- Dahiru, M. in Enabulele, O. I. (2015). *Acinetobacter baumannii* in bird's feces: A public health threat to vegetables and irrigation farmers. *Advances in Microbiology* 5: 693-698.
- Dillner, A. M., Schauer, J. J., Christensen, W. F., Cass, G. R. (2005). A quantitative method for clustering size distributions of elements. *Atmospheric Environment* 39: 1525-1537.
- Ewers, C., Guenther, S., Wieler, L., Schierack, P. (2009). Mallard ducks – a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. *Environmental Microbiology Reports* 1(6): 510-517.
- Fett, W. F., Cescutti, P., Wijey, C. (1996). Exopolysaccharides of the plant pathogens *Pseudomonas corrugata* and *Ps. flavescens* and the saprophyte *Ps. chlororaphis*. *Journal of Applied Microbiology* 81(2): 181-187.

- Francis, M. J., Doherty, R. R., Patel, M., Hamblin, J. F., Ojaimi, S., Korman, T. M. (2011). *Curtobacterium flaccumfaciens* septic arthritis following puncture with a Coxspur Hawthorn thorn. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7): 2759-2760.
- Garmyn, A., Haesebrouck, F., Hellebuyck, T., Smet, A., Pasmans, F., Butaye, P., Martel, A. (2011). Presence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in wild geese. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66(7): 1643-1644.
- Georgiev, V. S. (2003). *Opportunistic Infections: treatment and prophylaxis*. Humana Press, New York 71-72.
- Golob, Z. (2011). *Funkcionalna anatomija ptičev z osnovami ornitologije*. Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Maribor.
- Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Olsen, J. E. (1999). Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *Journal of Applied Microbiology* 87: 659-667.
- Günthard, H. in Pennekamp, A. (1996). Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 22: 1040-1045.
- Harrington, R. D., Lewis, C. G., Aslanzadeh, J., Stelmach, P., Woolfrey, A. E. (1996). *Oerskovia xanthineolytica* infection of a prosthetic joint: case report and review. *Journal of Clinical Microbiology* 34(7): 1821-1824.
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., Fridkin, S. K. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 10(1): 996-1011.
- Holten, K. B. in Onusko E. M. (2000). Appropriate prescribing of oral beta-lactam antibiotics. *American Family Physician* 62(3): 611-620.
- Janda, J. M. in 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.

- Janežič, S. in Trček, J. (2013). Mikrobiologija in genetika prokariontov: skripta z navodili za vaje za študijski program Biologija. Oddelek za biologijo, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Univerza v Mariboru.
- Janiga, M., Sedlářová, A., Rigg, R., Novotná, M. (2007). Patterns of prevalence among bacterial communities of alpine accentors (*Prunella collaris*) in the Tatra mountains. *Journal of Ornithology* 148: 135-143.
- Joshi, S. F. in Litake, G. M. (2013). *Acinetobacter baumannii*: An emerging pathogenic threat to public health. *World Journal of Clinical Infectious Diseases* 3(3): 25-36.
- Kim, B. H. in Lee, M. (2012). A case of bacteremia due to *Microbacterium oleivorans* identified by 16S rRNA sequencing analysis. *Korean Journal of Clinical Microbiology* 15(3): 110-113.
- King, A. S. in McLelland, J. (1979). Form and function in birds. Vol. 1. Academic Press, London: 69-81.
- Kohl, D. K. (2012). Diversity and function of the avian gut microbiota. *Journal of Comparative Physiology B* 182: 591-602.
- Kumar, S., Bandyopadhyay, M., Chatterjee, M., Mukhopadhyay, P., Pal, S., Poddar, S., Banerjee, P. (2013). Red discoloration of urine caused by *Serratia rubidae*: A rare case. *Avicenna Journal of Medicine* 3(1): 20-22.
- Lamberski, N., s sod. (2003). "A survey of the choanal and cloacal aerobic bacterial flora in free-living and captive red-tailed hawks (*Buteo jamaicensis*) and Cooper's hawks (*Accipiter cooperii*)." *Journal of Avian Medicine and Surgery* 17(3): 131-135.
- Liem, K. F., Bemis, W. E., Walker, W. F. jr., Grande, L. (2001). Functional anatomy of the vertebrates: an evolutionary perspective. Harcourt College Publishers, Fort Worth.
- Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M., Harmsen, D. (2008). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 46(6): 1946-1954.

- Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Svensson-Stadler, L., Moore, E. R. B., Manala, C. M. (2013). Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 329-340.
- Nonaka, Y., Nagae, M., Omae, T., Yamamoto, S., Horitani, R., Maeda, D., Yoshinaga, T. (2014). Community-acquired necrotizing fasciitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus*: a case report and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy* 20(5): 330-335.
- Ortega, N., Apaza, D., Gonzales, F., Salinas, J., Caro, M. R. (2012). Occurrence of Chlamydiaceae in non-symptomatic free-living raptors in Spain. *European Journal of Wildlife Research* 58: 351-355.
- Oudiz, R. J., Widlitz, A., Beckmann, J., Camanga, D., Alfie, J., Brundage, B. H., Barst, R. J. (2004). *Micrococcus*-associated central venous catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 126(1): 90-94.
- Panackal, A. A. (2013). *Microbacterium resistens* prosthetic joint infection: a case report due to a vancomycin-resistant coryneform and brief literature review of infections due to the genus. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 21(6): 349-354.
- Petkar, H., Li, A., Bunce, N., Duffy, K., Malnick, H., Shah, J. J. (2011). *Cellulosimicrobium funkei*: First report of infection in a nonimmunocompromised patient and useful phenotypic tests for differentiation from *Cellulosimicrobium cellulans* and *Cellulosimicrobium terreum*. *Journal of Clinical Microbiology* 49(3): 1175-1178.
- Petti, C. A. (2007). Detecting and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Medical Microbiology* 44: 1108-1114.
- Rihs, J. D., McNeil, M. M., Brown, J. M., Yu, V. L. (1990). *Oerskovia xanthineolytica* implicated in peritonitis associated with peritoneal dialysis: case report and review of *Oerskovia* infections in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 28(9): 1934-1937.
- Rivera, R., Cheema, A., Mai, J., Oehler, R., Sandin, R., Greene, J. (2012). *Curtobacterium* brain abscess: case report. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 20(4): 17-19.
- Rezzonico, F., Vogel, G., Duffy, B., Tonolla, M. (2010). Application of whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification

- and clustering analysis of *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology* 76(13): 4497-4509.
- Santos, S. S, Pardal, S., Proenca, D. N., Lopes, R. J., Ramos, J. A., Mendes, L., Morais, P. V. (2012). Diversity of cloacal microbial community in migratory shorebirds that use the Tagus estuary as stopover habitat and their potential to harbor and disperse pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 82: 63-74.
- Shah, V., Shah, S., Kambhampati, M. S., Ambrose, J., Smith, N., Dowd, S. E., McDonnell, K. T., Panigrahi, B., Green, T. (2011). Bacterial and Archaea community present in the Pine Barrens Forest of Long Island, NY: unusually high percentage of ammonia oxidizing bacteria. *PLoS ONE* 6(10): e26263.
- Stackebrandt, E. in Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33(4): 152-155.
- Stenkat, J., Krautwald-Junghanns, M. E., Schmitz Ornés, A., Eilers, A., Schmidt, V. (2014). Aerobic cloacal and pharyngeal bacterial flora in six species of free-living birds. *Journal of Applied Microbiology* 117: 1564-1571.
- Su, H., McKelvey, J., Rollins, D., Zhang, M., Brightsmith, D. J., Derr, J., Zhang, S. (2014) Cultivable bacterial microbiota of northern bobwhite (*Colinus virginianus*): A new reservoir of antimicrobial resistance? *PLoS ONE* 9(6): e99826.
- Tena, D., Martinez, N., Casanova, J., Garcia, J. L., Román, E., Medina, M. J., Sáez-Nieto, J. A. (2014). Possible *Exiguobacterium sibiricum* skin infection in human. *Emerging Infectious Diseases* 20(12): 2178-2179.
- Thompson, C. C., Chimetto, L., Edwards, R. A., Swings, J., Stackebrandt, E., Thompson, F. L. (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* 14:913.
- Tibra, N. K., Jalali, S., Reddy, A. K., Narayanan, R., Agarwal, R. (2010). Traumatic endophthalmitis caused by *Staphylococcus gallinarum*. *Journal of Medical Microbiology* 59: 365-366.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 249-266.

- van Dongen, W. F. D., White, J., Brandl, H. B., Moodley, Y., Merklings, T., Leclaire, S., Blanchard, P., Danchin, E., Hatch, S. A., Wagner, R. H. (2013). Age-related differences in the cloacal microbiota of a wild bird species. *BMC Ecology* 13:11.
- Vela, A. I., Casas-Diaz, E., Fernández-Garayzábal, S., Agusti, S., Porrero, M. C., Sánchez del Rey, V., Marco, I., Lavin, S., Domínguez, L. (2015). Estimation of cultivable bacterial diversity in the cloacae and pharynx in Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Microbial Ecology* 69(3): 597-607.
- Valdivia-Arenas, M. A. in Sood, N. (2008). *Micrococcus* bloodstream infection in patients with pulmonary hypertension on epoprostenol. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 16(5): 285-287.
- Vuong, C. in Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection* 4: 481-489.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58 (103): 236-244.
- Waite, D. W., Deines P., Taylor, M. W. (2012). Gut microbiome of the critically endangered New Zealand parrot, the kakapo (*Strigops habroptilus*). *PLoS ONE* 7(4): e35803.
- Waite, D. W. in Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology* 5: 223.
- Welker, M., Fastner, J., Erhard, M., van Döhren, H. (2002). Applications of MALDI-TOF MS analysis in cyanotoxin research. *Environmental toxicology* 17(4): 367-374.
- Wiśniewska, H., Niewolak, S., Korzeniewska, E., Filipkowska Z. (2007). Enterobacteriaceae family Bacteria in a mesotrophic lake (lake Długie Wigierskie) in the presence of black cormorants (*Phalacrocorax carbo*). *Polish Journal of Natural Sciences* 22(3): 486-499.
- Xin, F., Cai, D., Sun, Y., Guo, D., Wu., Jiang, D. (2014). Exploring the diversity of *Acinetobacter* populations in river water with genus-specific primers and probes. *Journal of General and Applied Microbiology* 60: 51-58.

- Xu, X., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K., Eichenlaub, R., Rajashekara, G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Infection of tomato seeds and plants. *Applied and Environmental Microbiology* 76(12): 3978-3988.
- Yamazaki, A., Li, J., Zeng, Q., Khokhani, D., Hutchins, W. C., Yost, A. C., Biddle, E., Toone, E. J., Chen, X., Yang, C. (2011). Derivates of plant phenolic compound affect the type III secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS-GacA two-component signal transduction system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(1): 36-43.
- Yeom, J. Shin, J., Yang, J., Kim, J., Hwang, G. (2013). ¹H NMR-based metabolite profiling of planktonic and biofilm cells in *Acinetobacter baumannii* 1656-2. *PLoS ONE* 8(3): e57730.

PRILOGE

Priloga 1: Seznam izolatov z metodo identifikacije, datumom in krajem vzorčenja ptic ter barvo bakterijske kolonije.

Št. vial	Oznaka vzorca	Metoda identifikacije	Datum ulova	Kraj ulova	Vir	Barva kolonij	Vrsta bakterije	Družina	Deblo
1	12H-4	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	pogorelček	rumena	<i>Microbacterium oxydans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
2	27HR	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	črnoglavka	bela	<i>Frigoribacterium faeni</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
3	30H-5	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	rumena	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
4	36H-1	16S sekvenciranje/MALDI-TOF	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	bela	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Moraxellaceae	Proteobacteria
6	G4-H1	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	oranžna	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Staphylococcaceae	Firmicutes
7	12H-2	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	pogorelček	brezbarvna	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
8	42H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	črnoglavka	bela	<i>Ochrobactrum thiophenivorans</i>	Brucellaceae	Proteobacteria
9	42H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	črnoglavka	roza	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Staphylococcaceae	Firmicutes
10	42H-7	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	črnoglavka	bela	<i>Pseudomonas orientalis</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
11	54H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	lišček	rumena	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
12	57H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	oranžna	<i>Microbacterium testaceum</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
13	57H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	oranžna	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	Bacillales XII Incertae Sedis	Firmicutes
14	57H-7	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	rumena	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
15	66H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	bela	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Moraxellaceae	Proteobacteria
16	84H-1	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	taščica	bela	<i>Serratia grimesii</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
17	12H-5	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	pogorelček	sv oranžna	<i>Microbacterium hominis</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
18	9H-3	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	vrtna penica	sv rumena	<i>Variovorax paradoxus</i>	Comamonadaceae	Proteobacteria
19	9H-1	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	vrtna penica	rumena	<i>Aeromicrobium ponti ali Aeromicrobium tamlense</i>	Nocardiodaceae	Actinobacteria
20	30H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	bela	<i>Sanguibacter keddieii</i>	Sanguibacteraceae	Actinobacteria

Priloga 1 (se nadaljuje)

21	33H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	rumena	<i>Microbacterium</i> sp.	Microbacteriaceae	Actinobacteria
22	36H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	oranžna	<i>Rhodococcus fascians</i>	Nocardiaceae	Actinobacteria
23	60H-8	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	sv rumena	<i>Frigoribacterium faeni</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
24	63H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	Promicromonosporaceae	Actinobacteria
25	G1-H1	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
26	G1-H8	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	brezbarvna	<i>Brochothrix campestris</i>	Listeriaceae	Firmicutes
27	G3-H1	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	bela	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Staphylococcaceae	Firmicutes
28	G4-H3	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Arthrobacter aurescens</i>	Micrococcaceae	Actinobacteria
29	60H-7	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	oranžna	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
30	57H-5	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	bela	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
31	66H-2	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
32	57H-2	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	bela	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	Rhizobiaceae	Proteobacteria
33	30H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	rumena	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> ali <i>M. hydrocarbonoxydans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
34	96H-4	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	poljski vrabec	bela	<i>Curtobacterium citreum</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
35	33H-2	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	bela	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
36	9H-2	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	vrtna penica	rumena	<i>Agromyces allii</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
37	9H-4	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	vrtna penica	rumena	<i>Aeromicrobium</i> sp. nov.	Nocardiodaceae	Actinobacteria
38	54H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	lišček	rumena	<i>Pseudomonas flavescens</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
39	56H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	rumena	<i>Okibacterium fritillariae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
40	G1-H3	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> ali <i>A. aurescens</i>	Micrococcaceae	Actinobacteria

Priloga 1 (se nadaljuje)

41	G1-H5	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> ali <i>A. aurescens</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
42	G1-H7	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	bela	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Moraxellaceae	Proteobacteria
43	G1-H6	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	bela	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Micrococcaceae	Actinobacteria
44	G5-H2	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	bela	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Staphylococcaceae	Firmicutes
45	99H-6	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	vrnja listnica	bela	<i>Rathayibacter festucae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
46	G4-H4	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Staphylococcaceae	Firmicutes
47	G1-H4	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	bela	<i>Brochothrix campestris</i>	Listeriaceae	Firmicutes
48	99H-3	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	vrnja listnica	bela	<i>Rathayibacter festucae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
49	42H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	črnoglavka	bela	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
50	99H-5	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	vrnja listnica	bela	<i>Rathayibacter festucae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
51	93H-1	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	kovaček	bela	<i>Paenibacillus</i> <i>xylanexedens/amylolyticus/tundra</i>	Paenibacillaceae	Firmicutes
53	96H-2	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	poljski vrabec	bela	<i>Paenibacillus</i> <i>xylanexedens/amylolyticus/tundra</i>	Paenibacillaceae	Firmicutes
55	90H-2	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	taščica	rumena	<i>Microbacterium xylanilyticum</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
56	G5-H3	16S sekvenciranje	10.12.2013	Maribor, Glavni trg	golob	rumena	<i>Oerskovia</i> sp.	Cellulomonadaceae	Actinobacteria
57	120H-1	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	rumeno bela	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
58	117H-1	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	bela	<i>Hafnia alvei</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
59	96H-3	16S sekvenciranje	15.10.2013	Hajdoše	poljski vrabec	oranžna	<i>Rhodococcus fascians</i>	Nocardiaceae	Actinobacteria

Priloga 1 (se nadaljuje)

60	105H-3	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	rumeni strnad	rumena	<i>Curtobacterium plantarum</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
61	63H-11	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
62	60H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	bela	<i>Chryseobacterium daecheongense</i>	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
63	57H-8	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	rumeno-bela	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
64	12H-1	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	pogorelček	umazano bel	<i>Bacillus aryabhatai</i>	Bacillaceae	Firmicutes
65	63H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	rumena	<i>Leucobacter exalbidus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
66	60H-4	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	rumena	<i>Chryseobacterium</i> sp. nov.	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
67	60H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	belkasta	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	Rhizobiaceae	Proteobacteria
68	120H-6	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	rumena	<i>Pantoea anthophila</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
69	66H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rdeče oranžna	<i>Rathayibacter festucae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
70	60H-5	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	rumena	<i>Microbacterium testaceum</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
71	63H-5	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	belkasta	<i>Agromyces</i> sp. nov.	Microbacteriaceae	Actinobacteria
72	63H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphylococcaceae	Firmicutes
73	63H-7	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	rumena	<i>Microbacterium resistens</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
74	105H-1	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	rumeni strnad	svetlo oranžna	<i>Rhodococcus fascians</i>	Nocardiaceae	Actinobacteria
75	66H-11	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
76	66H-10	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Sphingobacterium faecium</i>	Sphingobacteriaceae	Bacteroidetes
77	66H-9	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria

Priloga 1 (se nadaljuje)

78	102H-4	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	trstni strnad	brezbarvna	<i>Enterococcus plantarum</i>	Enterococcaceae	Firmicutes
80	105H-4	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	rumeni strnad	rumena	<i>Plantibacter flavus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
82	102H-3	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	trstni strnad	rumena	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Micrococcaceae	Actinobacteria
83	105H-2	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	rumeni strnad	bela	<i>Citrobacter gilleni</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
84	63H-2	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	rjavo-oranžna	<i>Pseudoxanthomonas koreensis</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
85	33H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	rumeno-bela	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
86	63H-12	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Agromyces terreus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
87	63H-9	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphylococcaceae	Firmicutes
88	120H-4	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	rumena	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
89	120H-2	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	brezbarvna	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
90	129H-1	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	plavček	rumena	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Micrococcaceae	Actinobacteria
91	129H-2	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	plavček	rumena	<i>Micrococcus</i> sp.	Micrococcaceae	Actinobacteria
92	63H-10	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphylococcaceae	Firmicutes
93	66H-3	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	oranžna	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
94	66H-6	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	oranžna	<i>Rhodococcus fasciens</i>	Nocardiaceae	Actinobacteria

Priloga 1 (se nadaljuje)

95	66H-7	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
96	63H-1	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	bela	<i>Pseudoxanthomonas koreensis</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
97	60H-13	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	poljski vrabec	bela	<i>Pseudomonas cedrina</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
98	63H-8	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	cikovt	rumena	<i>Pantoea agglomerans</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
99	12H-3	16S sekvenciranje	18.9.2013	Pragersko	pogorelček	rdeča	<i>Agrococcus versicolor</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
100	117H-2	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	rumena	<i>Pantoea anthophila</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria
101	102H-1	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	trstni strnad	rumena	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
102	123H	MALDI-TOF	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	siva pevka	bela	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria
103	120H-7	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	belo rumena	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
104	66H-8	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	ščinkavec	rumena	<i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i> ali <i>M. phyllosphaerae</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
105	30H-2	16S sekvenciranje	4.10.2013	Pragersko	siva pevka	rumena	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	Xanthomonadaceae	Proteobacteria
106	120H-5	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	oranžna	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Microbacteriaceae	Actinobacteria
107	117H-4	16S sekvenciranje	18.10.2013	Akumulacija Medvedce (Vrhloga)	taščica	rumeno oranžna	<i>Pantoea agglomerans</i>	Enterobacteriaceae	Proteobacteria