

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jana VOJVODA

**LETNA DINAMIKA IN RAZNOLIKOST AMONIJ-OKSIDIRAJOČIH
ARHEJ IN BAKTERIJ V OBALNEM MORJU TRŽAŠKEGA ZALIVA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ANNUAL DYNAMICS AND DIVERSITY OF AMMONIA-
OXIDYZING ARCHAEA AND BACTERIA IN COASTAL WATERS
OF THE GULF OF TRIESTE**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete 21.9.2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja Biotehnologije.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Morki biološki postaji v Piranu (Nacionalni inštitut za biologijo v Ljubljani), na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega Inštituta za Biologijo (NIB) v Ljubljani ter na Department Marine Biology, Faculty Center of Ecology, University of Vienna. Delo je bilo deloma financirano s strani Javne agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije oz. po novem Ministrstva za izobraževanje, znanost in šport RS. Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Valentina Turk, za somentorico pa prof. dr. Kristina Gruden.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: izr. prof. dr. Valentina TURK

Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Članica: izr. prof. dr. Kristina GRUDEN

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Ljubljana

Članica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 30. 12. 2013

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Jana Vojvoda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 574:561(497.4)(043.3)=163.6
KG	nitrifikacija/ oksidacija amonija/ bakterije/ arheje/ <i>Taumarchaeota</i> / <i>amoA</i> / mikrobne združbe/ morski agregati/ morski sneg / Tržaški zaliv/ DGGE/ PCR v realnem času/ 16S rRNA
AV	VOJVODA, Jana, univ. dipl. mikrobiologinja
SA	TURK, Valentina (mentorica) / GRUDEN, Kristina (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniški znanosti, področje biotehnologije
LI	2013
IN	LETNA DINAMIKA IN RAZNOLIKOST AMONIJ-OKSIDIRAJOČIH ARHEJ IN BAKTERIJ V OBALNEM MORJU TRŽAŠKEGA ZALIVA
TD	Doktorska disertacija
OP	XVI, 146 str., 16 pregl., 33 sl., 7 pril., 158 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proces oksidacije amonija je v plitvih obalnih morjih z izrazitimi sezonskimi nihanji temperature, slanosti in hranil, slabo raziskan. Vpliv okoljskih dejavnikov na razširjenost in sestavo združbe oksidatorjev amonija (AO) smo preučevali v morski vodi Tržaškega zaliva (severno Jadransko morje). S kvantifikacijo arhejskega in bakterijskega gena <i>amoA</i> z metodo qPCR smo spremljali dinamiko amonij-oksidirajočih arhej (AOA) in bakterij (AOB) v pridnenem ter površinskem sloju od aprila 2010 do marca 2011. Najvišjo koncentracijo AOA in AOB smo zaznali v pridnenem sloju, v obdobju nižjih temperatur (november, december). S statistično analizo smo potrdili neposredno povezavo števila AO z izmerjenimi koncentracijami nitrita in nitrata, ne pa tudi z ostalimi okoljskimi dejavniki. Izkazalo se je, da AOA predstavljajo večinski del amonij-oksidirajoče združbe v Tržaškem zalivu. Združba AOA (določena na podlagi DGGE in genskih knjižnic gena <i>amoA</i>) se ob prehodu iz toplejšega dela leta v hladnejši del spremeni. Na podlagi analize gena <i>amoA</i> se vse AOA iz Tržaškega zaliva uvrščajo v <i>Thaumarchaeota</i> klaster <i>Nitrosopumilus</i> , večinoma v <i>N. maritimus</i> - sorodni podklaster, znotraj katerega tvorijo dve skupini glede na čas vzorčenja. Iz novembrskega in decembrskega vzorca morske vode smo v obogateni kulturi (~98 %) izolirali amonij- oksidirajoči arheji, ki se filogenetsko uvrščata v rod <i>Nitrosopumilus</i> . Izmerjena optimalna temperatura za njunjo rast je ~30 °C, optimalna pH vrednost pa med 7,2 in 7,5. Morfološke znake celic v kulturah smo določili z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Analiza je pokazala prevlado celic pravilnih paličastih oblik, dolgih ~1 µm in širokih 0,2 µm. V nadaljnjih analizah smo določali prisotnost AOA in AOB v organsko bogatih agregatih morskega snega ter večjih agegatih, ki se pojavljajo v Severnem Jadranu. Določili smo strukturo arhejske in bakterijske združbe vezane na agregate in v okolni vodi. Tako v vodi kot na delcih morsksega snega prevladujejo AOA iz rodu <i>Nitrosopumilus</i> , modtem ko prisotnosti AOB v bakterijski združbi nismo zaznali. Bakterijska združba v morski vodi, agregatih in morskem snegu sestoji predvsem iz predstavnikov štirih bakterijskih razredov <i>Cyanobacteria</i> , <i>Alpha</i> - in <i>Gamma</i> – <i>Proteobacteria</i> ter <i>Bacteroidetes</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND	Dd
DC	UDC 574:561(497.4)(043.3)=163.6
CX	nitrification/ ammonia-oxydation/ bacteria/ archaea/ <i>Taumarchaeota</i> / <i>amoA</i> / microbial community/ marine aggregates/ marine snow/ Gulf of Trieste/ DGGE/ real time PCR /16S rRNA
AU	VOJVODA, Jana
AA	TURK, Valentina (supervisor) / GRUDEN, Kristina (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY	2013
TI	ANNUAL DINAMICS AND DIVERSITY OF AMMONIA-OXIDIZING ARCHAEA AND BACTERIA IN COSTAL WATERS OF THE GULF OF TRIESTE
DT	Doctoral Dissertation
NO	XVI, 146 p., 16 tab., 33 fig., 7 ann., 158 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In shallow coastal regions with pronounced seasonal variations, the ammonia-oxidation process is not well studied. We therefore examined how environmental factors influence the abundance and community structure of the ammonia-oxidizing community in the sea water of the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). An annual dynamic of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and bacteria (AOB) was assessed based on <i>amoA</i> gene quantification in the bottom and surface layer from April 2010 till March 2011. The highest concentrations of AOA and AOB cells were detected in late autumn- early winter (November, December) and were mostly higher near the bottom layer. Statistical analyses showed a clear positive correlation between the number of AOA and AOB and the concentrations of nitrate and nitrate, but no statistically significant correlation with other examined environmental factors have been observed. Our results show that AOA is the most abundant AO in the Gulf of Trieste and that its structure changes during the summer to winter transition period. Based on <i>amoA</i> gene all AOA detected in the Gulf of Trieste belong to <i>Nitrosopumilus</i> cluster, most of them in <i>N. maritimus</i>-related subcluster within which they form two distinct groups according to the sampling season. From the November and December seawater samples, we isolated AOA in an enrichment cultures (~98 %). Both strains were phylogenetically classified into the genus <i>Nitrosopumilus</i>. Their temperature optimum is ~30 °C, and a pH optimum between 7.2 and 7.5. The morphology of the cultures was determined with Scan Electron Microscopy (SEM) and the analysis showed the prevalence of rod-shaped cells ~1 µm long and 0.2 µm wide, similar to <i>N. maritimus</i>. To examine whether AOA and AOB are also present in marine snow and larger organic aggregates, which are characteristic for the northern Adriatic Sea, we assessed the composition of marine snow- attached and free-living archaeal and bacterial communities based on 16S rRNA gene variability. In both types of samples AOA from the genus <i>Nitrosopumilus</i> dominated the archaeal community, while AOB were not detected in any of the examined samples. The bacterial community in marine snow, aggregates and seawater is mostly dominated by the members of four bacterial taxa: <i>Cyanobacteria</i>, <i>Alpha-</i> and <i>Gamma</i> – <i>Proteobacteria</i> and <i>Bacteroidetes</i>.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	XI
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.2 KROŽENJE DUŠIKA V MORSKIH OKOLJIH.....	3
2.2.1 Nitrifikacija in oksidacija amonija.....	6
2.2.1.1 Amonij v morskih okoljih.....	6
2.2.1.2 Proces nitrifikacije	6
2.2.1.3 Amonij-oksidirajoče bakterije (AOB)	7
2.2.1.4 Amonij- oksidirajoče arheje (AOA)	10
2.2.1.4.1 Mezofilne arheje - <i>Thaumarchaeota</i>	10
2.2.1.4.2 Amonij- oksidirajoče arheje debela <i>Thaumarchaeota</i>	13
2.2.2 Razširjenost in diverziteta arhejskih in bakterijskih genov <i>amoA</i> v morskih okoljih	13
2.2.3 AOA v čistih in visoko obogatenih kulturah kot modelni organizem.....	17
2.2.3.1 Genomske in metagenomske analize AOA	19
2.3 MORSKI SNEG IN MAKROAGREGATI.....	21
2.3.1 Pojav morskega snega in njegov ekološki pomen v oceanih in priobalnih morjih.....	21
2.3.2 Pojavnost morskega snega in makroagregatov v Tržaškem zalivu	23
2.3.3 Vloga in raznolikost prokariontske združbe na agregatih morskega snega.....	25

3	CILJI IN HIPOTEZE	29
4	MATERIALI IN METODE.....	31
4.2	LETNA DINAMIKA AMONIJ-OKSIDIRAJOČIH ARHEJ IN BAKTERIJ	31
4.2.1	Značilnosti Tržaškega zaliva	31
4.2.2	Vzorčenje in obdelava vzorcev	32
4.2.3	Določanje koncentracije nutrientov	33
4.2.4	Izolacija DNA	33
4.2.5	Določanje števila amonij-oksidirajočih arhej (AOA) in bakterij (AOB) .	34
4.2.5.1	Priprava plazmidnih standardov	35
4.2.5.2	Kvantifikacija genov <i>amoA</i> ter gena MGI -16S rRNA z metodo qPCR	38
4.2.6	Gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (DGGE; denaturing gradient gel electrophoresis)	39
4.2.6.1	Pomnoževanje arhejskega gena <i>amoA</i> za ločevanje z DGGE	40
4.2.6.2	Priprava poliakrilamidnega denaturacijskega gela in potek ločevanja genov <i>amoA</i>	41
4.2.6.3	Izdelava knjižnic arhejskega gena <i>amoA</i> in obdelava sekvenc	42
4.3	PESTROST ARHEJSKE IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V MORSKEM SNEGU IN VEČJIH ORGANSKIH AGREGATIH	44
4.3.1	Vzorčenje in obdelava vzorcev	44
4.3.2	CARD-FISH	44
4.3.3	Izolacija DNA/RNA	46
4.3.4	Priprava cDNA.....	47
4.3.5	T-RFLP fingerprinting bakterijske združbe.....	47
4.3.6	Izdelava 16S rRNA in 16S rDNA genskih knjižnic	50
4.3.7	Filogenestka in statistična obdelava podatkov.....	51
4.4	IZOLACIJA AMONIJ- OKSIDIRAJOČE ARHEJE	53
4.4.1	Vzpostavitev obogatenih kultur AOA.....	53
4.4.1.1	Obogatena kultura AOA iz organskih makroagregatov	53
4.4.1.2	Vzpostavitev obogatene kulture AOA iz morske vode	54
4.4.1.3	Vzdrževanje obogatene kulture AOA.....	56
4.4.1.4	Določanje koncentracije nutrientov	56

4.4.1.5	Izolacija DNA in kvantifikacija gena <i>amoA</i>	57
4.4.1.6	Določanje čistosti kulture z metodo CARD-FISH	57
4.4.2	Kloniranje gena 16S rRNA in gena <i>amoA</i> ter filogenetska analiza	58
4.4.3	Test delovanja antibiotikov.....	58
4.4.4	Potrjevanje prisotnosti AOB v kulturi	59
4.4.5	Določanje optimalnih pogojev za rast (temperatura in pH)	59
4.4.6	Izdelava rastne krivulje.....	59
4.4.7	Opazovanje celične morfologije s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM).....	61
5	REZULTATI.....	63
5.2	AMONIJ-OKSIDIRAJOČE ARHEJE IN BAKTERIJE V OBALNIH VODAH TRŽAŠKEGA ZALIVA	63
5.2.1	Letna dinamika AOA in βAOB v površinskem in pridnenem sloju ter vpliv fizikalno-kemijskih dejavnikov na njihovo porazdelitev.....	63
5.2.1.1	Letna dinamika fizikalno – kemijskih parametrov	63
5.2.1.2	Letna dinamika bakterijskega in arhejskega gena <i>amoA</i>	64
5.2.2	Razporeditev AOA in βAOB po vodnem stolpu v poletnem in zimskem obdobju	69
5.2.3	Razmerje med številom arhejskih genov <i>amoA</i> in MGI 16S rRNA geni..	71
5.2.4	Analiza diverzitete znotraj združbe AOA	71
5.2.4.1	Struktura združbe AOA določena z metodo denuracijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE)	72
5.2.4.2	Filogenetska analiza združbe AOA	73
5.3	PESTROST ARHEJSKE IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V MORSKEM SNEGU IN VEČJIH ORGANSKIH AGREGATIH	76
5.3.1	Mikroskopske analize prokariontske združbe v morskem snegu in agregatih ter okolni vodi	77
5.3.2	Pestrost prokariontske združbe v morskem snegu in agregatih ter okolni vodi	78
5.3.2.1	Pestrost bakterijske združbe v morskem snegu, agregatih in okolni vodi	79
5.3.2.1.1	Ocena raznolikosti bakterijske združbe z metodo T-RFLP	79

5.3.2.1.2	Podrobnejša filogenetska analiza bakterijske združbe iz morskih agregatov in okolne vode.....	82
5.3.2.2	Pestrost arhejske združbe v morskih agregatih in okolni vodi	87
5.4	IZOLACIJA AMONIJ- OKSIDIRAJOČE ARHEJE	90
5.4.1	Izolacija in priprava kulture v bogatitvenem gojišču	90
5.4.1.1	Obogatitev AOA iz agregatov Tržaškega zaliva	90
5.4.1.2	Obogatitev AOA iz morske vode Tržaškega zaliva	92
5.4.2	Povečevanje koncentracij AOA v kulturi.....	95
5.4.3	Določanje optimalnih pogojev za rast kulture AOA	97
5.4.4	Dinamika rasti AOA v visoko obogateni kulturi	99
5.4.5	Taksonomska uvrstitev obogatenih sevov AOA	102
5.4.6	Morfologija v obogateni kulturi izoliranih arhej.....	104
6	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	107
6.2	RAZPRAVA.....	107
6.2.1	Amonij-oksidirajoče arheje in bakterije v obalnih vodah Tržaškega zaliva –letna dinamika.....	107
6.2.1.1	Filogenetska raznolikost združbe amonij- oksidirajočih arhej v Tržaškem zalivu.....	113
6.2.2	Pestrost arhejske in bakterijske združbe v morskem snegu in večjih organskih agregatih	119
6.2.3	Izolacija amonij- oksidirajoče arheje.....	123
6.3	SKLEPI.....	125
7	POVZETEK (SUMMARY)	127
7.2	POVZETEK.....	127
7.3	SUMMARY	130
8	VIRI	133
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 4.1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri qPCR za kvantifikacijo arhejskih in bakterijskih genov <i>amoA</i> ter gena MGI – 16S rRNA	39
Preglednica 4.2: Sestava denaturacijskih raztopin za izdelavo poliakrilamidnega gela za analizo DGGE AOA združbe.....	41
Preglednica 4.3: Nukleotidno zaporedje sond za označevanje bakterijskih, arhejskih in <i>Euryarchaea</i> celic v postopku CARD-FISH.....	46
Preglednica 4.4: Sestava gojišča MAM za bogatitev združbe nitrifikatorjev iz morskih okolij.....	53
Preglednica 4.5: Sestava modificiranega gojišča SCM z dodatkom morske vode v koncentraciji 5 % ter sestava osnovnih raztopin za pripravo le tega.....	55
Preglednica 5.1: Povezave med številčnostjo AOA/BAOB in koncentracijami anorganskih hranil, meritvami fizikalnih parametrov in BCP v površinskem in pridnenem sloju Tržaškega zaliva.....	68
Preglednica 5.2: Razmerja med številom arhejskih genov <i>amoA</i> in 16S rRNA geni skupine MGI v vodnem stolpu Tržaškega zaliva tekom leta.....	71
Preglednica 5.3: Pestrost združbe AOA v Tržaškem zalivu tekom leta.....	75
Preglednica 5.4: Fizikalno - kemijski parametri izmerjeni v vzorcih morske vode Tržaškega zaliva v obdobju vzorčenja morskega snega in agregatov.....	77
Preglednica 5.5: Število bakterijskih OTU enot pridobljenih s T-RFLP analizo bakterijskih 16S rRNA (16S rDNA) genov in 16S rRNA (16S rRNA) iz vzorcev morskega snega in agregatov v Tržaškem zalivu.....	80
Preglednica 5.6: Pregled kazalcev diverzitete s porazdelitvijo vrst bakterijskih genskih knjižnic 16S rDNA in 16S rRNA v vzorcih morskega snega in okolne vode v Tržaškem zalivu.....	82
Preglednica 5.7: Pregled kazalcev vrstne diverzitete, pestrosti, ocenjene diverzitete in enakomernosti porazdelitve vrst v arhejskih genskih knjižnicah 16S rDNA iz vzorcev morskega snega in okolne vode v Tržaškem zalivu.....	88

Preglednica 5.8: Spremljanje rasti kulture po dodatku antibiotika oziroma po predhodni filtraciji inokuluma skozi 0,45 µm filter. Vsi antibiotiki so bili dodani v končni koncentraciji 100 µg/ml.	96
Preglednica 5.9: Generacijski čas, hitrost rasti in specifična hitrost oksidacije amonija v kulturi N25 v primerjavi z arhejo <i>N. maritimus</i> .* - povzeto po Martens-Habbena in sod. 2009.	101
Preglednica 5.10: Rezultati primerjave sekvenc gena za 16S rRNA iz obogatenih kultur AOA s sekvencami v bazi podatkov GenBank.	102
Preglednica 5.11: Rezultati primerjave sekvenc gena <i>amoA</i> iz obogatenih kultur AOA s sekvencami v bazi podatkov GenBank.	103

KAZALO SLIK

Slika 2.1: Mikrobne pretvorbe dušika nad, pod in vzdolž oksidno/suboksidne meje v morskem okolju (povzeto po Francis in sod. (2007)).....	4
Slika 2.2: Shematski prikaz poteka oksidacije NH_3 pri AOB <i>Nitrosomonas europaea</i> (povzeto po Stahl in De La Torre (2012))	9
Slika 2.3: Shematski prikaz filogenetskih povezav med arhejskimi linijami (povzeto po Pester in sod., 2011).....	12
Slika 2.4: Filogenetskso drevo pridobljeno z analizo sekvenc arhejskih genov <i>amoA</i> (povzeto po Pester in sod. ((2012))).	15
Slika 2.5: Prikaz razdelitve klastra <i>Nitrosopumilus</i> glede na izvor analiziranih genov <i>amoA</i> (povzeto po Beman in sod. (2008))......	16
Slika 2.6: Predlagan potek oksidacije amonija pri arheji <i>Nitrosopumilus maritimus</i> po treh alternativnih poteh (povzeto po Stahl in De la Torre (2012)).	20
Slika 2.7: Shematski prikaz procesov in poti mikrobne razgradnje na in v okolici makroskopskih agregatov. POM – partikulatna organska snov (povzeto po Simon in sod. (2002)).	22
Slika 2.8: Primer večjih agregatov morskega snega v Tržaškem zalivu ter način vzorčenja.....	24
Slika 2.9: Elektronske mikrografije sluznih agregatov iz Severnega Jadrana (30. junij 2004) (povzeto po Turk in sod. (2010))......	26
Slika 4.1: Geografski položaj oceanografske boje Vida in hkrati položaj vzorčevalnega mesta 00BF	32
Slika 5.1: Sezonska dinamika AOA in β AOB, koncentracije anorganskih hranil (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+), slanosti, temperature in bakterijske produkcije (BCP) na globini 5 m v Tržaškem zalivu.	66
Slika 5.2: Sezonska dinamika AOA in β AOB, koncentracije hranil (NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+), slanosti, temperature in bakterijske produkcije (BCP) na globini 21 m v Tržaškem zalivu.....	67
Slika 5.3: Vertikalna razporeditev AOA in β AOB, koncentracij dušikovih anorganskih spojin, temperature in slanosti vzdolž vodnega stolpca v poletnem času (julij 2010) v Tržaškem zalivu.....	69

Slika 5.4: Vertikalna razporeditev AOA in β AOB, koncentracij dušikovih anorganskih spojin, temperature in slanosti vzdolž vodnega stolpca v zimskem času (februar 2011) v Tržaškem zalivu.....	70
Slika 5.5: Fotografija gelov DGGE analize fragmentov arhejskega gena <i>amoA</i> iz morske vode vzorčene v Tržaškem zalivu na globini 5 m (A) in 21 m (B) od aprila 2010 do marca 2011 (označeni s prvo črko meseca).....	72
Slika 5.6: Dendrogram analize razvrščanja v skupine DGGE fragmentov arhejskega gena <i>amoA</i> iz posameznih mesečnih vzorcev morske vode od aprila 2010 do marca 2011 na globini 5 m (A) in 21 m (B) v Tržaškem zalivu.....	73
Slika 5.7: Filogenetsko drevo arhejskega gena <i>amoA</i> – sestava združbe AOA v vzorcih morske vode pobranih v štirih različnih mesecih (november, februar, april in julij) v pridnenem sloju (21 m) v Tržaškem zalivu.	74
Slika 5.8 Relativni delež arhejskih, <i>Euryarchaeota</i> ter bakterijskih celic glede na totalno število DAPI obarvanih celic v vzorcih morske vode (A) in morskega snega (B) pridobljen z analizo CARD-FISH.	78
Slika 5.9: nMDS prikaz podobnosti bakterijskih združb v vzorcih morskega snega in vode iz Tržaškega zaliva določenih na podlagi rezultatov T-RFLP analize bakterijskih 16S rRNA genov in 16S rRNA.....	81
Slika 5.10: Sestava bakterijske združbe v vzorcih agregatov in okolne morske vode v Tržaškem zalivu vzorčenih 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010	83
Slika 5.11: Natančnejša filogenetska analiza najbolj številčnih bakterijskih skupin (>20 % bakterijske populacije) v vzorcih agregatov in okolne morske vode Tržaškega zaliva vzorčenih 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010.....	86
Slika 5.12: Z metodo združevanja sosedov (angl. Neighbour-Joining) izdelano filogenetsko drevo arhejske združbe pridobljene iz agregatov in okolne vode v Tržaškem zalivu vzorčene 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010.....	89
Slika 5.13: Spremljanje rasti kultur amonij- oksidirajoče arheje pridobljenih iz morskega agregata po precepljanju v modificirano SCM gojišče in gojenju pri različnih pogojih.....	92
Slika 5.14: Koncentracije AOA genov <i>amoA</i> in dušikovih spojin v kulturi V25 (A) in N25 (B) po prvem nacepljanju morske vode Tržaškega zaliva in prvem precepljanju (druga generacija V25 (C) in N25 (D)).....	94

Slika 5.15: Epifluorescentni mikroskopski posnetek celic prokariontske združbe kulture N25.	94
Slika 5.16: Spremljanje oksidacije NH_4^+ po dodatku različnih končnih koncentracijah antibiotika eritromicin.	97
Slika 5.17: Rast arhejske kulture N25 pri različnih temperaturah in ocenjen generacijski čas.	98
Slika 5.18: Rast arhejske kulture N25 pri različnih pH vrednosti gojišča.	98
Slika 5.19: Prvi primer rastne krivulje arheje v visoko obogateni kulturi N25 in potek oksidacije amonija do nitrita pri 25 °C.	100
Slika 5.20: Drugi primer rastne krivulje arheje v visoko obogateni kulturi N25 in potek oksidacije amonija do nitrita pri 25 °C.	101
Slika 5.21: Elektronska posnetka vzorca kulture N25 v pozni eksponentni fazi rasti.	104
Slika 5.22: Elektronska posnetka vzorca kulture V25 v pozni logaritemski fazi rasti.	105
Slika 6.1: Skupno filogenetsko drevo vseh sekvenc arhejskega gena <i>amoA</i> pridobljenih tekom celotne raziskave.	117

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sestava pufrov uporabljenih pri metodi CARD-FISH.....	149
Priloga B1: Rezultati kvantifikacije gena <i>amoA</i> z metodo qPCR na globini 5 m tekom leta (april 2010 – marec 2011).....	151
Priloga B2: Rezultati kvantifikacije gena <i>amoA</i> z metodo qPCR na globini 21 m tekom leta (april 2010 – marec 2011).....	151
Priloga B3: Rezultati kvantifikacije genov <i>amoA</i> vzdolž vodnega stolpca meseca julija 2010	152
Priloga B4: Rezultati kvantifikacije genov <i>amoA</i> vzdolž vodnega stolpca meseca februarja 2011	152
Priloga C1: Fizikalno-kemijski parametri izmerjeni na globini 5 m ob vzorčenju morske vode za namen kvantifikacije genov <i>amoA</i>	153
Priloga C2: Fizikalno-kemijski parametri izmerjeni na globini 21 m ob vzorčenju morske vode za namen kvantifikacije genov <i>amoA</i>	154

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

^{13}C	težji ogljikov izotop
$^3\text{H}\text{-Leu}$	z radioaktivnim izotopom vodika, tritijem, označen leucin
AMO	encim amonij-monooksigenaza
<i>amoA</i>	gen ki kodira α -podenoto encima AMO
AO	mikroorganizem ki oksidira amonij
AOA	arheje, ki oksidirajo amonij
AOB	bakterije, ki oksidirajo amonij
β AOB	betaproteobakterije, ki oksidirajo amonij
APS	amonijev persulfat
BCP	bakterijska produkcija ogljika (Bacterial Carbon Production)
bp	bazni par
BSA	albumin iz govejega seruma
CARD-FISH	fluorescentna in situ hibridizacija z depozicijo kataliziranega reporterskega barvila (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization)
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilindol
DGGE	denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dH_2O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotidtrifosfat
DOM	raztopljena organska snov (Dissolved Organic Matter)
DON	raztopljeni organski dušik (Dissolved Organic Nitrogen)
EDTA	etilendiamintetraacetat
EPS	eksopolisaharidne substance
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija (Fluorescent in-situ Hybridization)
HRP	hrenova peroksidaza
HAO	hidroksil-amin oksidoreduktaza
MCGI	skupina morskih krenarhej I (Marine Crenarchaeota Group I) tudi MGI (Marine Group I)
N_2	kemijska oznaka za dušik

N ₂ O	kemijska oznaka za didušikov oksid
NH ₃	kemijska oznaka za molekulo amoniaka
NH ₄ ⁺	kemijska oznaka za ionizirajočo obliko molekule amonijevega kationa
NH ₂ OH	hidroksilamin
NO	kemijska oznaka za dušikov oksid
NO ₂ ⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrita
NO ₃ ⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrata
OTU	avtonomna taksonomska enota
PBS	fosfatni pufer s soljo
PCR	verižna reakcija s polimerazo (Polymerase Chain Reaction)
POM	partikulatna organska snov (Particulate Organic Matter)
PON	partikulatni organski dušik (Particulate Organic Nitrogen)
PSU	enota za slanost morske vode (Practical Salinity Unit)
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SDS	natrijev dodecilsulfat (Sodium Dodecyl Sulphate)
SEM	vrstični elektronski mikroskop (Scanning Electron Microscope)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
Tris	tris (hidroksimetil) aminometan
T-RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih fragmentov po restrikciji (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)

1 UVOD

Oksidacija amonija je prva stopnja v procesu nitrifikacije, ki je pomemben člen pri kroženju dušika v okolju. Amonij (NH_4^+), ki ga ob razgradnji organske snovi v okolico sproščajo heterotrofni mikroorganizmi (amonifikacija), v oksičnih okoljih služi kot vir energije za rast nitrifikatorjev, ki ga v procesu nitrifikacije oksidirajo do NO_3^- . Prvo in omejujočo stopnjo nitrifikacije predstavlja oksidacija amonija, ki jo vršijo amonij-oksidatorji (AO). Več kot stoletje je veljalo prepričanje, da oksidacijo amonija vršijo samo nekatere bakterije iz razredov beta- in gama- proteobakterij. Pred slabim desetletjem pa so Venter in sodelavci (2004) odkrili presenetljivo povezavo med arhejskimi geni 16S rRNA in homologi bakterijskega gena *amoA*, ki kodira α -podenoto encima amonij-monooksiganaza (AMO), prvega encima v procesu oksidacije amonija. V čisti kulturi izolirana arheja *N. maritimus*, ki oksidira NH_4^+ do NO_2^- , je kmalu za tem potrdila domnevo, da so poleg amonij-oksidirajočih bakterij (AOB) v morskih okoljih oksidatorji NH_4^+ tudi mezofilne arheje (AOA). Nadaljnje raziskave so pokazale, da so AOA mnogo bolj razširjene kot AOB in danes veljajo za najpomembnejše vršilce tega procesa v oceanih ter v mnogih kopenskih ekosistemih. Proces se danes uporablja tudi v biotehnoloških procesih čiščenja odpadnih vod.

V primerjavi z združbami AOB se je pokazalo, da je za združbe AOA v različnih morskih okoljih, značilna zelo velika genetska pestrost (Francis in sod., 2005). Kateri okoljski dejavniki vplivajo na razširjenost in pestrost posamezne skupine AO v morskih okoljih pa še ni povsem znano. V morju Tržaškega zaliva so sezonska nihanja temperature, slanosti in koncentracij hranil, zaradi plitvosti bazena (< 30 m) ter številnih pritokov rek, zelo izrazita. Ker so tako mikrobne združbe v Tržaškem zalivu tekom leta izpostavljene mnogim spremembam v okolju, le ta predstavlja idealni modelni sistem za preučevanje vloge posameznih dejavnikov na razširjenost in sestavo mikrobnih združb, kot je združba AO.

Poleg sprememb v koncentracijah anorganskih hranil, predvsem zaradi vnosa s kopnega, se v pomladnem in poletnem času pojavljajo večje koncentracije organske snovi, ki se ob stabilnih vremenskih razmerah agregirajo v t.i. morski sneg ali večje skupke, aggregate.

Pojav velikih agregatov, ki lahko dosežejo velikosti tudi po več metrov je zelo značilen za Severni Jadran (pregled v Turk in sod., (2007)). Sestava bakterijskih združb, ki naseljujejo morski sneg ali večje organske agregate pa je slabo poznana, medtem ko združbe mezofilnih arhej v Jadranskem morju, še niso bile raziskovane. Organsko obogateni agregati kot tudi manjši delci morskega snega, predstavljajo mikrookolja, kjer se zaradi pospešene razgradnje organske snovi sprošča amonij. Poleg tega se pri razgradnji porablja kisik, kar vodi do nastanka suboksičnih mikrookolij v katerih lahko potekala oksidacija NH_4^+ s strani AOA, kar je bilo že potrjeno v drugih suboksičnih okoljih (Coolen in sod., 2007).

Kljub nenehnemu razvoju modernih molekularnih metod, ki jih danes s pridom uporabljamo pri raziskovanju mikrobnih združb v okolju, so za poznavanje fiziologije posameznih mikrobnih skupin, izrednega pomena predstavniki izolirani v akseničnih kulturah. Amonij-oksidirajoče arheje so bile odkrite šele nedavno, njihova rast pa je zaradi kemolitotrofnega metabolizma počasna, zato ne preseneča, da je raziskovalcem do sedaj uspelo v akseničnih kulturah pridobiti zelo malo predstavnikov amonij- oksidirajočih arhej v akseničnih kulturah. Vsaka na novo vzpostavljena kultura je tako izrednega pomena za nadaljnje raziskave fiziologije teh slabo raziskanih mikroorganizmov ter njihove vloge pri kroženju dušika v oceanih in v atmosferi.

2 PREGLED OBJAV

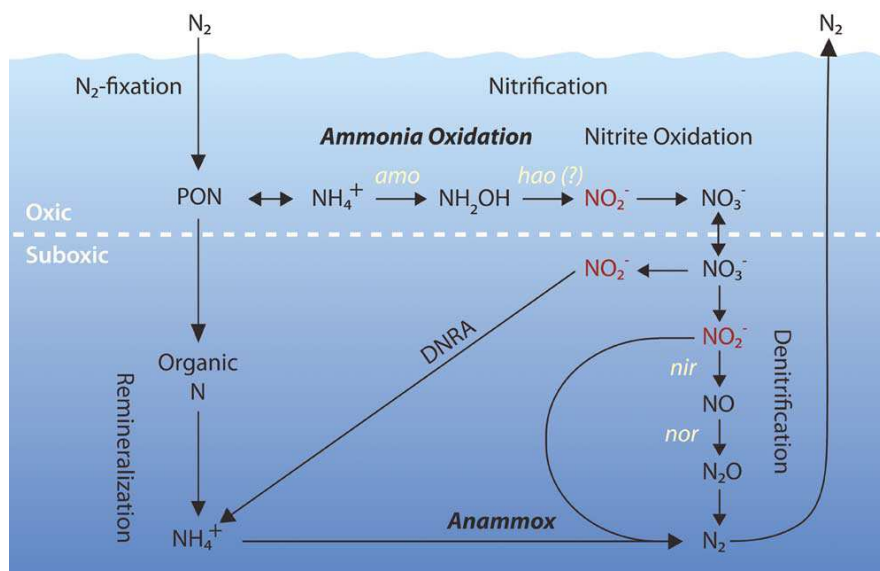
2.2 KROŽENJE DUŠIKA V MORSKIH OKOLJIH

Dušik (N) je eden izmed esencialnih elementov za življenje vseh organizmov, saj je kot gradnik beljakovin in nukleinskih kislin, udeležen v skoraj vseh bioloških procesih. Dušikov krog je zato eden od najpomembnejših biogeokemičnih ciklov v naravi. Največji rezervoar dušika predstavlja atmosferski dušik - N_2 , ki sestavlja kar 78 % atmosfere, vendar je zaradi svoje trojne vezi izredno nereaktiven in zato nedostopen za veliko večino živih organizmov. Podobno kot na kopnem tudi v morski vodi dušik nastopa najpogosteje kot raztopljeni N_2 (Gruber, 2008). Iz istih razlogov je dušik velikokrat limitativen element za biološko produktivnost v morskih ekosistemih ter tako vpliva tudi na kroženje drugih pomembnih elementov, še posebej ogljika in fosforja (Ryther in Dunstan, 1971; Gruber, 2008). Dušikov krog je zelo kompleksen, saj dušik zavzema veliko različnih oksidativnih stanj in tvori različne kemijske spojine. Večino pretvorb v morskem dušikovem krogu vršijo morski mikroorganizmi, ki dušikove spojine izrabljajo za izgradnjo biomolekul ali kot vir energije (Gruber, 2008).

Dušik vstopa v prehranjevalno verigo s procesom fiksacije N_2 , ki jo v morskih okoljih opravljajo diazotrofne cianobakterije med katerimi je najbolj raziskana vrsta *Trichodesmium* spp. (Sohm in sod., 2011). Te s pomočjo encima nitrogenaze reducirajo N_2 in dušik vgradijo v celično biomaso, kar označujemo kot partikulatni organski dušik (Particulate Organic Nitrogen - PON). Pri procesih razgradnje organske snovi s strani heterotrofnih mikroorganizmov prihaja do sproščanja amonija. Proces poteka v oksičnih in suboksičnih slojih in ga imenujemo amonifikacija (Gruber, 2008). Gre za stranski proces, saj je glavno vodilo heterotrofne razgradnje oksidacija v organsko snov vezanega ogljika, ki heterotrofnim bakterijam služi kot vir energije in vir ogljika za izgradnjo bakterijske biomase. Razgradnja PON pa ne vodi vedno do popolne remineralizacije dušika, del dušika se lahko sprošča v obliki raztopljenega organskega dušika (Dissolved Organic Nitrogen - DON), ki ponovno vstopa v proces razgradnje s strani heterotrofnih bakterij (Slika 2.1). V prisotnosti kisika združba nitrifikatorjev oksidira NH_4^+ v procesu nitrifikacije do nitrata (NO_3^-). V suboksičnih slojih pa NO_3^- kot akceptor elektronov sodeluje v procesu

denitrifikacije, kjer denitrifikatorji reducirajo NO_3^- preko nitrita (NO_2^-), dušikovega oksida (NO) in didušikovega oksida (N_2O) do N_2 , ki se zopet sprošča v atmosfero (Francis in sod., 2007). Tako je dušikov krog sklenjen.

V anaerobnih okoljih, kjer se zaradi odsotnosti nitrifikacije kopiči NH_4^+ , je bil leta 1995 odkrit proces, ki ga vodijo posamezne bakterije iz reda *Planctomycetales* (Mulder in sod., 1995). Te v odsotnosti kisika oksidirajo NH_4^+ do N_2 pri čemer je sprejemnik elektronov NO_2^- . Proces so poimenovali ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation) (Mulder in sod., 1995; Jetten in sod., 1998).



Slika 2.1: Mikrobne pretvorbe dušika nad, pod in vzdolž oksično/suboksične meje v morskem okolju (povzeto po Francis in sod. (2007)).

Na sliki je nitrit označen z rdečo, zaradi njegove pomembne vloge kot metabolni vmesni produkt znotraj in med procesi dušikovega kroga. Geni, ki kodirajo encime ključnih procesov so označeni z belo: *amo*- amonij-mono-oksigenaza; *hao*- bakterijska hidroksilamin oksidoreduktaza (?= gen/encim pri AOA ni bil najden); *nir*- nitritna reduktaza; *nor*- reduktaza dušikovega oksida. Prevod izrazov: nitrification - nitrifikacija, ammonia oxidation - oksidacija amonija, nitrite oxidation - oksidacija nitrita, N_2 -fixation - fiksacija N_2 , remineralization - remineralizacija, oxic - oksično območje, suboxic - suboksično območje, DNRA (dissimilatory nitrate reduction to ammonium) - disimilatorna redukcija nitrita do amonija.

Figure 2.1: Microbial nitrogen transformations above, below and across an oxic/anoxic interface in the marine environment (from Francis et al. (2007)).

Nitrite is highlighted in red to emphasize the central role of this metabolic intermediate/product within and between N cycling pathways. Key functional genes discussed in the text are shown in white: *amo*- ammonia mono-oxygenase; *hao*- bacterial hydroxylamine oxidoreductase (?=unknown gene/enzyme in AOA); *nir*- nitrite reductase; and *nor*- nitric oxide reductase, DNRA- dissimilatory nitrate reduction to ammonium.

Biološka fiksacija N_2 je kot vir dušika v prehranjevalni verigi pomembna predvsem v odprtih oligotrofnih morjih, medtem ko so v priobalnih morjih pomembni vir dušika tudi vnosi antropogenega dušika s kopnega, katerih vir so predvsem pritoki rek in nenadzorovanimi izpusti industrijskih in gospodinjskih komunalnih odpadkov (Gruber in Galloway, 2008). Vnos antropogenega reaktivnega dušika v morje se je bistveno povečal v zadnjih 100 letih po odkritju Haber-Boschovega postopka za kemijsko fiksacijo atmosferskega N_2 v amonij, ki je omogočil proizvodnjo umetnih dušikovih gnojil. Zaradi njihove povečane uporabe na kmetijskih površinah mobilne oblike dušika (NO_3^- in NO_2^-) s spiranjem prsti prehajajo v podtalnico, v reke in končno v morje. Človek je tako s svojim vplivom močno pospešil globalni krog dušika. Ker je dušik v morskem okolju večkrat limitativen element, njegovi povečani vnosi v priobalnih morjih povzročajo prekomerno primarno in sekundarno produkcijo in s tem prispevajo k procesu evtrofikacije (Rabalais, 2002). Povečana primarna produkcija v oceanih, sicer pripomore k večjemu ponoru atmosferskega CO_2 , vendar ima tudi negativne posledice. Ob povečani fitoplanktonski in bakterijski produktivnosti (cvetenje morja) se znižuje koncentracija raztopljenega kisika, dviguje se meja suboksičnosti vodnega stolpca in s tem se povečuje sproščanje toplogrednih plinov, kot sta dušikovega oksid (NO) in didušikov oksid (N_2O), ki nastajata tekom denitrifikacije in nitrifikacije v suboksičnem okolju (Gruber, 2008). Dolgoročni vplivi pospešenega dušikovega cikla na kroženja ostalih elementov, predvsem na cikel ogljika, še niso povsem znani. Poznavanje in razumevanje poteka dušikovih pretvorb ter razumevanje fiziologije in dinamike vpletenih mikrobov je zato ključnega pomena za globalno zmanjševanje vplivov na okolje.

2.2.1 Nitrifikacija in oksidacija amonija

Nitrifikacija je proces, ki povezuje najbolj reducirano (NH_4^+) in najbolj oksidirano (NO_3^-) obliko dušika in je pomemben pri kroženju dušika v morskem okolju, kot tudi v sladkovodnih ekosistemih, v tleh in v biotehnoloških procesih čiščenja odpadnih vod. Proces nitrifikacije vrši združba nitrifikatorjev, ki kot kemoavtotrofni aerobi z oksidacijo amonija in NO_2^- pridobivajo energijo za izgradnjo celične biomase iz CO_2 . Z oksidacijo, tekom amonifikacije sproščenega NH_4^+ do NO_3^- , povežejo procese razgradnje organske snovi z denitrifikacijo, ki dušik zopet pretvori v atmosferski N_2 .

2.2.1.1 Amonij v morskih okoljih

V vodi raztopljen NH_3 tvori amonijev kation (NH_4^+) in deluje kot baza. NH_3 in NH_4^+ sta v vodni raztopini v dinamičnem ravnovesju:

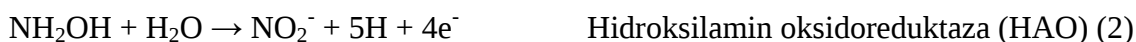


na katerega močno vpliva pH in temperatura vode. Ob znižanju pH vrednosti se ravnovesje pomakne v desno – kar pomeni zviševanje koncentracije NH_4^+ . Pri običajni pH vrednosti morske vode ($\sim 8,1$), prevladuje amonijev ion NH_4^+ , NH_3 pa predstavlja približno 6 % vsega amonija. Celokupen amonij ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) v morskem okolju zato večkrat označujemo kar z NH_4^+ . Poleg amonifikacije je lahko vir amonija v morski vodi tudi vnos iz atmosfere, kadar je koncentracija NH_3 v atmosferi večja kot v morski vodi. Tak pojav so opazili v nekaterih obalnih regijah Severnega in Baltiškega morja, ki so zelo obremenjena z industrijsko in kmetijsko dejavnostjo (Asman in sod., 1994).

2.2.1.2 Proces nitrifikacije

Nasprotno kot pri denitrifikaciji, kjer posamezen mikroorganizem vrši celoten večstopenjski proces ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), je proces nitrifikacije razdeljen na dve stopnji, ki ju vršita ločeni skupini prokariontov (Francis in sod., 2007):

- Prva in obenem limitativna stopnja v procesu nitrifikacije je **oksidacija amonija** do nitrita. Proces je dobro preučen v primeru amonij-oksidirajočih bakterij in poteka v dveh korakih: (1) v prvem koraku encim amonij-monooksigenaza (AMO) oksidira amonij do vmesnega produkta hidroksilamina (NH_2OH). (2) v drugem koraku encim hidroksilamin-oksidoreduktaza (HAO) oksidira NH_2OH do NO_2^- .



Čeprav je za prvi korak oksidacije amonija potreben vnos redukcijske energije, je končna energetska bilanca pozitivna (2e^-), saj se pri oksidaciji NH_2OH sprostijo 4e^- . Energijski izkupiček celotnega procesa ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) je $\Delta G^\circ = -271 \text{ kJ / mol}$, kar je malo glede na obsežno spremembo oksidacijskega stanja (iz -3 do +3).

Oksidacijo amonija vršijo bakterijski in arhejski amonij-oksikatorji (AO), ki jih poimenujemo s predpono *Nitrozo-*.

- Druga stopnja nitrifikacije je **oksidacija nitrita** (NO_2^-) do nitrata (NO_3^-), ki jo opravljajo bakterije - nitrit-oksikatorji z encimom nitritna oksidoreduktaza



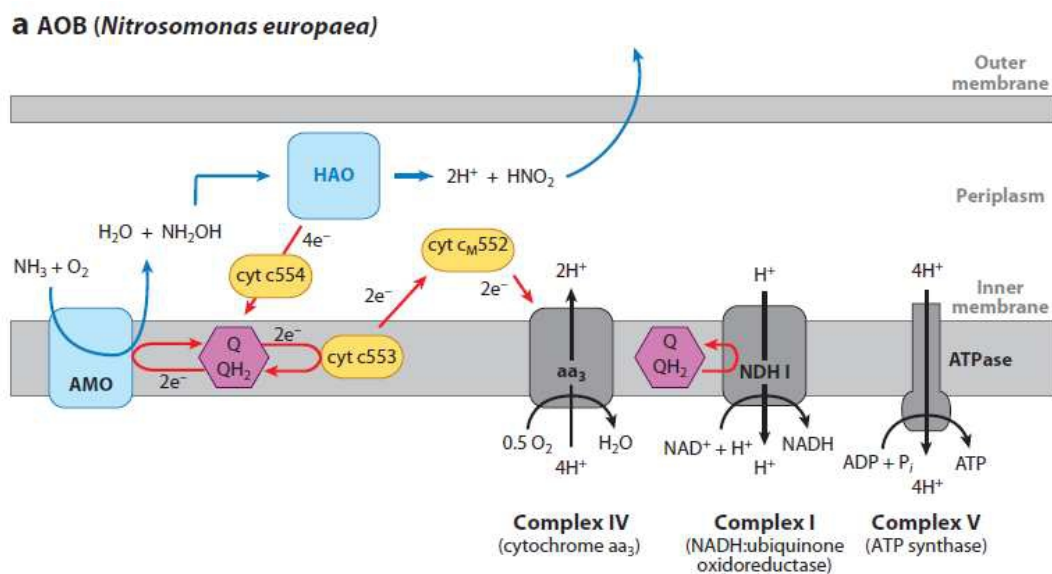
Bakterije, ki vršijo drugo stopnjo nitrifikacije, poimenujemo s predpono *Nitro-*. Analoga nitrit oksidoreduktaze pri arhejah še niso našli.

2.2.1.3 Amonij-oksidirajoče bakterije (AOB)

Leta 1980 je Winogradsky prvi ugotovil, da proces nitrifikacije v tleh opravljata dve ločeni skupini bakterij: oksikatorji amonija (AOB) in oksikatorji nitrita (NOB) in proces povezal s kemoavtotrofijo (Winogradsky, 1890). Predstavnike obeh skupin je tudi izoliral v čisti kulturi (Ward, 2011). Danes je znano, da so AOB avtototrofne bakterije, ki z oksidacijo amonija pridobijo energijo za sintezo organske snovi iz CO_2 preko Kalvinovega cikla. Najnižja koncentracija amonija pri kateri AOB še lahko rastejo je $\sim 1 \mu\text{M}$ pri nevtralnem

pH. Koncentracije NH_4^+ pa so v oceanih pogosto nižje in nekatere AOB so se prilagodile tako, akumulirajo amonij znotraj celice v visokih koncentracijah (Schmidt in sod., 2004). Raziskave nakazujejo, da AOB aktivno črpajo NH_4^+ preko citoplazemske membrane s pomočjo transporterjev tipa Amt/Rh (Weidinger in sod., 2007). Struktura takšnega integralnega membranskega proteina NeRh50V je bila določena v primeru *Nitrosomonas europaea*, vendar natančen mehanizem prenosa NH_4^+ še ni povsem pojasnjen (Li in sod., 2007). Predvidevajo, da se NH_4^+ ob vezavi na periplazemski del proteina NeRh50 deprotonira in v nenabiti obliki (NH_3) prehaja skozi kanal v citoplazmo, kje se ponovno protonira v NH_4^+ (Van Kim in sod., 2006; Tremblay in Hallenbeck, 2009). Aktivni transport AOB zagotavlja dovolj visoko intracelularno koncentracijo amonija za nemoten potek oksidacije tudi pri nizkih koncentracijah amonija.

Oksidacija amonija pri AOB poteka po zgoraj opisani enačbi (enačba (1) in (2)). Prvi korak - pretvorbo NH_3 do NH_2OH , katalizira amonij-monooksigenaza (AMO), ki se nahaja v citoplazemski membrani. Doslej ta transmembranski metaloprotein še ni bil izoliran v aktivni obliki, zato strukturo in mehanizem njegovega delovanja preučujejo z biokemijskimi študijami bakterijskih kultur, oziroma lizatov celic, ter na podlagi genomskih študij in primerjav s sorodnim proteinom metan-monooksidazo (pMMO) (Arp in sod., 2002; Gilch in sod., 2009). Raziskave topne oblike proteina izoliranega iz bakterije *N. europaea* so pokazale, da je AMO sestavljen iz dveh podenot: AmoA ali α (27 kD) in AmoB ali β (28 kD). Čeprav *amo*-operon (*amoCAB*) vsebuje zapis za tri peptide, domnevajo, da peptid AmoC (31,4 kD) ni podenota encima AMO. Katalitično oksidacijo amonija naj bi omogočala α -podenota (AmoA), katere aktivni center vsebuje baker (Cu). Poleg bakra AMO vsebuje tudi železo (Fe) in cink (Zn), vendar vloga teh kovin pri oksidaciji amonija še ni povsem znana (Gilch in sod., 2009). Ker AMO ni aktivna pri pH vrednostih nižjih od 6,5 njegov substrat pa je NH_3 , domnevajo, da oksidacija ne poteka na periplazmatski strani membrane, kjer je $\text{pH} < 6$ (*N. europaea*), ampak na citoplazemski strani, kjer je pH vrednost okrog 7,5 (*N. europaea*), kar pomeni da je tudi koncentracija NH_3 višja (Gilch in sod., 2009). AMO za oksidacijo ene NH_3 molekule potrebuje dva elektrona in en atom kisika (Slika 2.2).



Slika 2.2: Shematski prikaz poteka oksidacije NH_3 pri AOB *Nitrosomonas europaea* (povzeto po Stahl in De La Torre (2012))

AMO – amonij-monooksigenaza, HAO – hidroksilamin-oksidoreduktaza, cyt – citokromi

Figure 2.2: Proposed respiratory pathways for ammonia oxidation in AOB *Nitrosomonas europaea* (from Stahl & De La Torre (2012))

AMO- ammonia monooxygenase, HAO – hydroxylamine-oxydoreductase, cyt - cytochromes

Nadaljnja oksidacija, od hidroksilamina (NH_2OH) do nitrita (NO_2^-), poteka v periplazmi, kjer reakcijo katalizira encim hidroksilamin-oksidoreduktaza (HAO) (enačba (2), Slika 2.2). Mehanizem transporta NH_2OH iz citoplazme v periplazmo ni poznan. Elektroni ($4e^-$), ki se sprostijo pri delovanju HAO pa potujejo preko citokromov v dihalni verigi in ustvarjajo elektrokemijski koncentracijski gradient, s kopičenjem ionov H^+ v periplazmi (Slika 2.2).

Filogenetsko večino bakterij, ki oksidirajo amonij, uvrščamo v razred betaproteobakterij, monofiletsko skupino *Nitrosomonadaceae* s tremi rodovi: *Nitrosomonas*, *Nitrospira* in *Nitrosovibrio*. Izjema je bakterijski rod *Nitrosococcus*, ki ga uvrščamo v razred gamaproteobakterij in predstavlja samostojen rod znotraj družine *Chromatiaceae* (Costa in sod., 2006). Čeprav si beta- in gama- proteobakterijski rodovi AOB niso sorodni, izhajajo iz skupnega fotosintetskega prednika in so se ločili v skupine še pred razvojem nitrifikacijskih zmogljivosti (Teske in sod., 1994).

V genskih knjižnicah gena 16S rRNA morskih okolij prevladujejo sekvence bakterij iz rodu *Nitrosospira* (Bano in Hollibaugh, 2000; O'Mullan in Ward, 2005), medtem ko so AOB iz rodu *Nitrosomonas*, pogosteje določene v obogatenih kulturah AOB. Edini rod gamaproteobakterijskih AOB - *Nitrosococcus*, zajema le tri vrste: *N. oceani*, *N. halophilus* in *N. watsonii*. Vse tri vrste so bile izolirane iz morja, oziroma iz slanih okolij. *N. oceani* je razširjen v vseh morjih, vendar je število njihovih sekvenc v genskih knjižnicah zelo nizko in prav tako je raznolikost sekvenc zelo nizka (Ward in O'Mullan, 2002; O'Mullan in Ward, 2005).

2.2.1.4 Amonij- oksidirajoče arheje (AOA)

Več kot sto let po prvi izolaciji amonij-oksidirajočih bakterij je veljalo prepričanje, da so AOB glavni vršilci oksidacije amonija. Vendar pa izmerjene hitrosti oksidacije amonija v čistih kulturah AOB niso sovpadale s hitrostmi oksidacije amonija v oceanih (Kaplan, 1983). Poleg tega je bilo presenetljivo tudi dejstvo, da oksidacija v oceanih poteka pri zelo nizkih koncentracijah amonija. Meritve so namreč pokazale, da je afiniteta za NH_4^+ v akseničnih kulturah vzgojenih AOB (*Nitrosomonas europaea*: $K_m=0,3-1,6 \times 10^3 \mu\text{M}$ NH_4^+) več kot 1000- krat nižja od afinitete izmerjene v oceanih ($K_m < 0,1 \mu\text{M}$ NH_4^+) (Hashimoto in sod., 1983; Kaplan, 1983).

2.2.1.4.1 Mezofilne arheje - *Thaumarchaeota*

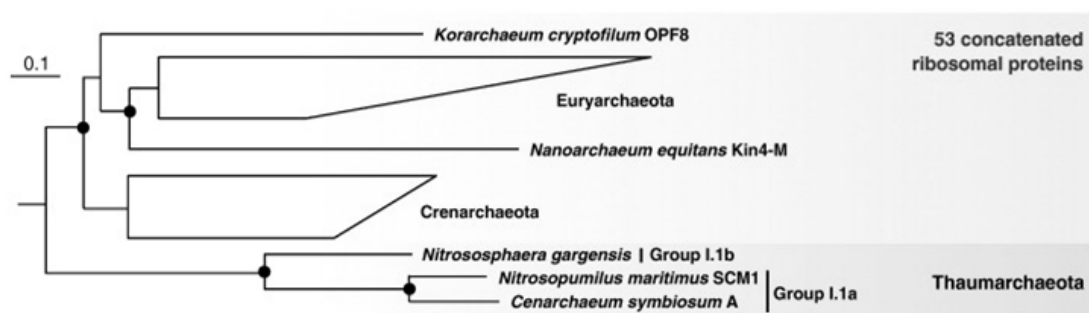
Razvoj molekularnih tehnik v osemdesetih letih je v področje morske mikrobiologije prinesel veliko novih spoznanj. Morske prokariote so do tedaj preučevali le s pomočjo biokemičnih in gojitvenih metod. Kasneje se je izkazalo, da lahko gojimo približno le 1 % vseh prokariotskih vrst. Z odkritjem verižne reakcije s polimerazo (PCR) in metod sekvenciranja ter uporabo bakterijskih genov 16S rRNA za namen filogenetskih analiz, se je izkazalo, da je pestrost mikrobov v naravnih okoljih mnogo večja kot so predvidevali. Velik preboj pri raziskovanju pestrosti mikroorganizmov v morju predstavlja odkritje mezofilnih arhej v vzorcu morske vode. Fuhrman in sodelavci (1992) so v vzorcu iz Tihega oceana našli sekvence gena 16S rRNA, katerih podobnost je bila z do tedaj znanimi bakterijskimi sekvencami izjemno nizka, bile pa so bolj sorodne ekstremofilnim

termofilnim arhejam. Izkazalo se je, da gre za mezofilne arheje, kar je bilo v nasprotju z dotlej znanim dejstvom, da so arheje omejene izključno na ekstremna okolja (visoke temperature, povišane slanosti in visoke koncentracije žvepla). Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov v vzorcih morske vode je DeLong (1992) sekvenciral 16S rRNA gene prisotnih arhej ter ugotovil, da prevladujeta dve arhejski liniji in so predstavniki le teh dovolj razširjeni v obalnih morjih, da predstavljajo pomembne tekmece heterotrofnim bakterijam. Znotraj že poznanega arhejskega filogenetskega drevesa sta ti dve skupini tvorili samostojna klastra, ki so jih poimenovali skupina I in skupina II. Skupina II se je na podlagi distančne analize zanesljivo uvrstila v deblo *Euryarchaeota*, v katerem se je kasneje oblikovala še ena skupina mezofilnih arhej – Skupina III (Munson in sod., 1997), predstavniki pa izhajajo iz različnih morskih okolij (Bano in sod., 2004). Uvrstitev skupine I v deblo *Crenarchaeota* je bila manj zanesljiva. Znotraj debela *Crenarchaeota* so bile uvrščene ekstremne termofilne vrste z visokim deležem G+C baznih parov (0,63 - 0,68), medtem ko je delež G+C baznih parov skupine I nižji (~ 0,51). Kljub temu, so bile arheje skupine I uvrščene v deblo *Crenarchaeota*, ker znotraj gena 16S rRNA vsebujejo določeno 12-nukleotidno zaporedje, znano kot »podpis« debela *Crenarchaeota*.

Kasnejše raziskave so pokazale, da so mezofilne arheje v morskih okoljih zelo razširjene. Z razvojem nukleotidnih sond specifičnih za vsako skupino se je izkazalo, da so *Euryarchaeota* iz skupine II razširjene predvsem v površinskem sloju obalnega morja (npr. kanal St. Barbara), krenarhej iz skupine I pa v globinah pod 100 m (Massana in sod., 1997). Tudi Murry in sodelavci (1999) so potrdili, da število arhejskih 16S rRNA genov narašča z globino in se na večjih globinah po deležu (20-40 %) približuje deležu bakterij. Z globino naraščajoče število krenarhej so potrdili tudi v Tihem oceanu pod globino 1000 m (Karner in sod., 2001). Na podlagi štetja fluorescentno označenih celic označenih z metodo fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) so avtorji izračunali, da celokupno število arhej v oceanih znaša $1,3 \times 10^{28}$, celokupno število bakterij pa $3,1 \times 10^{28}$ (Karner in sod., 2001). To potrjuje, da so mezofilne arheje, poleg bakterij najbolj pogosta prokariotska skupina v oceanih. Številne pa so tudi študije prisotnosti 16S rRNA genov sorodnih *Crenarchaeota* skupini I, v različnih okoljih, v tleh (Bintrim in sod., 1997; Buckley in sod., 1998; Simon in sod., 2000; Ochsenreiter in sod., 2003), estuarijih (Crump in Baross, 2000), različnih regijah oceanov (DeLong, 1998), ter morskih in sladkovodnih sedimentih (Schleper in

sod., 1997; Vetriani in sod., 1998). Z naraščajočim številom sekvenc gena 16S rRNA arhejske skupine I iz različnih morskih in kopenskih ekosistemov so se znotraj skupine oblikovale različne podskupine (Slika 2.3). Večina sekvenc iz morskih okolij se je uvrstila v Skupino I.1a (MGI – Marine Group I), večina sekvenc iz vzorcev tal pa v Skupino I.1b (Schleper in Nicol, 2010).

Filogenetska analiza na podlagi sekvenc genov za 53 ribosomalnih proteinov, ki so postale dostopne z objavo zaporedij celotnih genomov arhej, je pokazala, da se je skupina mezofilnih krenarhej ločila od ostalih arhej še pred ločitvijo debel *Crenarchaeota* in *Euryarchaeota*. Zato je bila predlagana nova taksonomska opredelitev, kjer mezofilne arheje tvorijo povsem novo arhejsko deblo *Thaumarchaeota* (iz grške besede »thaumas«; čudo) (Brochier-Armanet in sod., 2008). Za predstavnike debla *Thaumarchaeota* je značilen lipid taumarheol, ki so ga prvotno imenovali krenarheol (Damsté in sod., 2002; Pester in sod., 2011)



Slika 2.3: Shematski prikaz filogenetskih povezav med arhejskimi linijami (povzeto po Pester in sod., 2011).

Filogenetsko drevo temelji na koreninjeni metodi največje podobnosti neprekinjenega zaporedja 53-ih ribosomalnih proteinov (4853 aminokislinskih ostankov). Velikostna označba predstavlja 10 % ocenjene evolucijske oddaljenosti.

Figure 2.3: Schematic phylogeny of Archaea (from Pester et al. (2011)).

Phylogenetic tree redrawn after a rooted maximum likelihood tree of 53 concatenated ribosomal proteins of Archaea (4853 deduced amino acid positions)). The scale bar represents 10 % estimated sequence divergence.

Kljub številnim objavam o prisotnosti mezofilnih arhej v naravnih okoljih, je njihova ekološka vloga in fiziologija ostala dolgo nepojasnjena. Študije na osnovi označevanja celic po metodi FISH v kombinaciji z mikroradiografijo (MAR-FISH) so pokazale, da polovica morskih arhej privzema proste aminokisline iz okolja, kar nakazuje na njihove heterotrofne lastnosti (Ouverney in Fuhrman, 2000; Teira in sod., 2004; Teira in sod., 2006). Istočasno so analize izotopske sestave arhejskih lipidov nakazovale, da so lahko tudi avtotrofi (Pearson in sod., 2001), kar je potrdil tudi eksperiment privzema [^{13}C]-bikarbonata (Wuchter in sod., 2003).

2.2.1.4.2 Amonij- oksidirajoče arheje debela *Thaumarchaeota*

Razvoj novih visoko-zmogljivih metod določanja nukleotidnih zaporedij in metagenomike, je potrdil da oksidacijo amonija v oceanih in kopenskih ekosistemih poleg AOB vršijo tudi predstavniki debela *Thaumarchaeota*. Pri analizi metagenomskih podatkov vzorcev vode Sargaškega morja so namreč odkrili del genoma, ki glede na gen 16S rRNA pripada krearhejski skupini I, hkrati pa vsebuje homologe bakterijskih genov, ki kodirajo encim amonij- monooksigenaza (*amoA*, *amoB* in *amoC*). Istočasno so bili odkriti *amo* geni v povezavi z arhejskim genom 16S rRNA, v fozmidni knjižnici talnih združb (Treusch in sod., 2005). Količina transkripta (cDNA) v fozmidni knjižnici odkritega gena *amoA* krenarhejske skupine I je naraščala po dodatku amonija v vzorcih tal (Treusch in sod., 2005). To je okrepilo domnevo o obstoju amonij-oksidirajočih arhej, ki je bila končno potrjena, ko so Könneke in sodelavci (2005) opisali prvo v čisti kulturi izolirano amonij-oksidirajočo arhejo *Nitrosopumilus maritimus*. Sledile so raziskave razširjenosti in raznolikosti arhejskega gena *amoA* v različnih morskih in kopenskih okoljih.

2.2.2 Razširjenost in diverziteta arhejskih in bakterijskih genov *amoA* v morskih okoljih

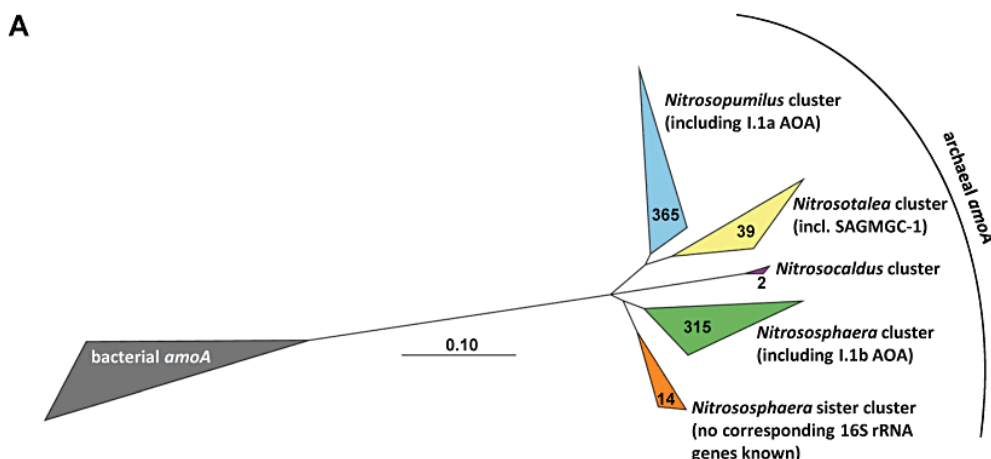
Za analize filogenetskih odnosov in razširjenosti amonij-oksidirajočih arhej in bakterij kot genski označevalec uporabljamo gen *amoA*, ki kodira α -podenoto encima AMO. Ta omogoča boljšo filogenetsko ločljivost med zelo sorodnimi sevi kot gen 16S rRNA, ki je zaradi pomembne fiziološke funkcije, evolucijsko bolj ohranjen (Francis in sod., 2005).

Primerjava koncentracij arhejskih in bakterijskih *amoA* genov je pokazala, da so AOA bolj razširjene kot AOB tako v odprtih, kot tudi v priobalnih morjih Severnega morja, Atlantskega in Tihega oceana ter vzhodnega Mediterana (Wuchter in sod., 2006; Mincer in sod., 2007; Agogue in sod., 2008; De Corte in sod., 2009). Koncentracije AOA gena *amoA* so v omenjenih študijah variirale od 10 do 6×10^5 kopij *amoA*/ml morske vode, odvisno od letnega časa, globine in vzorčevane vodne mase. Arhejski *amoA* geni so bili v nekaterih primerih tudi do tri velikostne razrede bolj razširjeni od bakterijskih. Vertikalna razporeditev je pokazala, da se koncentracija arhejskih genov *amoA* z globino povečuje in je najvišja na dnu evfotične cone (50 – 100 m), kjer so bile izmerjene nižje koncentracije klorofila (Beman in sod., 2007; Mincer in sod., 2007; Agogue in sod., 2008). Višja koncentracija arhejskih *amoA* genov je bila zaznana tudi v območjih nižjih koncentracij kisika (oxygen minimum zones), kar lahko pomeni, da so AOA odgovorne za produkcijo toplogrednega plina N_2O , ki je nastaja v območjih z nizkimi koncentracijami kisika (Francis in sod., 2005; Lam in sod., 2007; Beman in sod., 2008).

Mnoge raziskave so pokazale, da koncentracije arhejskega gena *amoA* v različnih morskih okoljih sovpadajo s koncentracijami 16S rRNA genov MGI (Marine Group I), tako časovno (Wuchter in sod., 2006), kot tudi po globini vodnega stolpca (Mincer in sod., 2007; Beman in sod., 2008). To nakazuje, da oksidatorji amonija predstavljajo večinski del arhejske skupine MGI. Koncentracije arhejskega *amoA* gena kljub temu le redko sovpadajo s koncentracijami NH_4^+ , pozitivne korelacije so bile zaznane v povezavi s koncentracijami NO_3^- in hitrostjo oksidacije NH_4^+ (Wuchter in sod., 2006; Beman in sod., 2008; Newell in sod., 2013).

Filogenetska analiza vseh dotlej dostopnih zaporedij arhejskega gena *amoA* iz različnih okolij (tla, morska voda, sladka voda, morski sediment, vroči vrelci in estuariji), je pokazala, da se amonij-oksidirajoče arheje razvrščajo v pet monofiletskih klastrov: klaster *Nitrosopumilus* (pred tem imenovan morski ali I.1a AOA linija (DeLong, 1998)), klaster *Nitrososphaera* (pred tem imenovan talni ali I.1b AOA linija), klaster *Nitrosocaldus* (pred tem imenovan ThAOA ali HWCGIII linija), klaster *Nitrosotalea* in klaster *Nitrososphaera*-sesterski klaster (Pester in sod., 2012) (Slika 2.4). Klastri so bili poimenovani po prvemu v kulturi izoliranem posamezniku in ne združujejo le AOA iz posameznega okolja, kot so

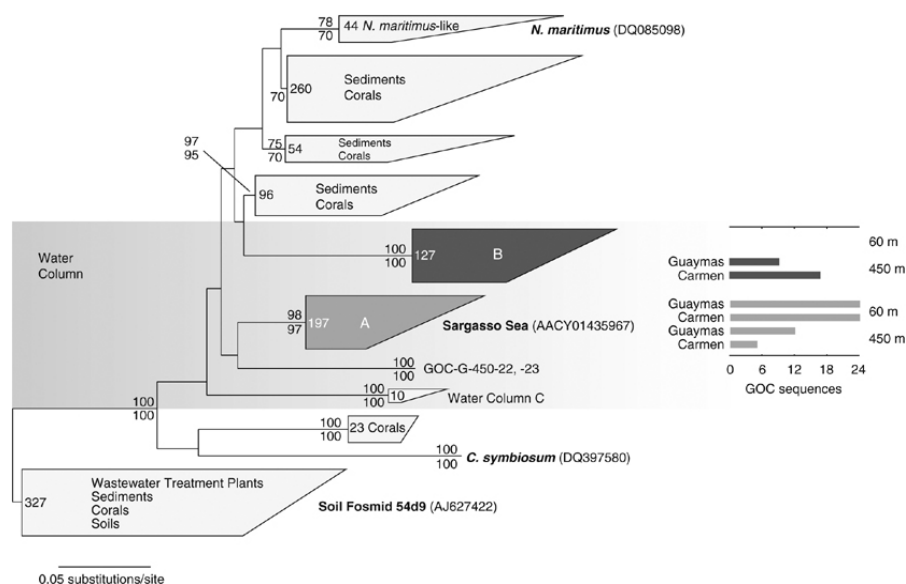
predvidevali pred tem, ampak se v njih znajdejo AOA iz večih različnih okolij. Na primer največji klaster - klaster *Nitrosopumilus*, kljub prevladi sekvenc iz morskih okolij vsebuje tudi sekvence iz kopenskih in sladkovodnih okolij. Še večja habitatna pestrost je zajeta znotraj klastera *Nitrososphaera*, ki je bil pred tem poimenovan »talni« klaster (Pester in sod., 2012).



Slika 2.4: Filogenetskso drevo pridobljeno z analizo sekvenc arhejskih genov *amoA* (povzeto po Pester in sod. (2012)).

Figure 2.4: Phylogenetic relationships among archaeal *amoA* sequences (from Pester et. al. (2012)).

Klaster *Nitrosopumilus*, ki združuje največ AOA iz morskega okolja, se nadalje razdeli na več podklastrov, ki so jih v preteklosti poimenovali glede na izvor prvih zaznanih predstavnikov. Tako so v grobem klaster razdelili na podklaster »vodni stolp« ter podklastre iz ostalih morskih okolij (sediment, korale) (Slika 2.5). Izkazalo se je, da se geni *amoA* v vzorcih iz globljih slojev oceana filogenetsko razlikujejo od genov v vzorcih iz površinskih slojev. Tako se geni *amoA* znotraj podklastra »vodni stolpec« ločijo na dve skupini A: »plitvo-morska« (shallow) in B: »globoko-morska« (deep) skupina AOA (Hallam in sod., 2006). Beaman in sodelavci (2010) so s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi preverili razširjenost teh dveh skupin po globini vodnega stolpca in pokazali, da se je večina genov pridobljenih iz globine 60 m uvrstila v »plitvo-morsko« skupino, medtem ko so se geni iz globine 450 m uvrstili v »plitvo-morsko« in v »globoko-morsko« skupino (Slika 2.5).



Slika 2.5: Prikaz razdelitve klastra *Nitrosopumilus* glede na izvor analiziranih genov *amoA* (povzeto po Beman in sod. (2008)).

Klaster *Nitrosopumilus* predstavlja zgornja glavna veja drevesa. Znotraj skupine »vodni stolpec« (water column) sta označeni podskupina A (svetlo sivo; »plitvo-morska«) ter podskupina B (temno sivo; »globoko-morska«). Na desni strani, poleg klastrov, stolpni diagram podaja število sekvenc glede na globino in posamezno vzorčno mesto. Filogenetsko drevo je izdelano po metodi združevanja sosedov (angl. Neighbour Joining method) in testirano z bootstrap metodo.

Figure 2.5: Structure of *Nitrosopumilus* cluster regarding the source of the analysed *amoA* genes (from Beman et al. (2008)).

Nitrosopumilus cluster is shown as the upper main branch of the tree. The water column group A is shaded light gray (»shallow«) and the group B is shaded dark gray (»deep«); bar graphs indicate the number of sequences recovered in clone libraries from the GOC that are contained in each group. Generated using Neighbour-joining bootstrap tree construction method.

Nedavno so Sintés in sodelavci (2013) pokazali, da so AOA znotraj skupine A in B vezane na okolja z različnimi koncentracijami NH_4^+ . AOA iz skupine A so prilagojene na višje koncentracije amonija »HAC« (High ammonia concentration AOA), medtem ko so AOA iz skupine B prisotne v okoljih z nizkimi koncentracijami NH_4^+ (»LAC« -Low ammonia concentration). Kar nakazuje na obstoj dveh različic encima AMO, ki se razlikujeta glede na afiniteto do substrata (Sintés in sod., 2013).

2.2.3 AOA v čistih in visoko obogatenih kulturah kot modelni organizem

Konneke in sodelavci so leta 2005 prvi opisali izolirano AOA v čisti kulturi, ki so jo zaradi majhne velikosti celic poimenovali *Nitrosopumilus maritimus* (lat. *Pumilus* : skrat). *N. maritimus* je bil izoliran iz morske vode tropskega akvarija, natančneje iz prodnatega sedimenta v akvariju (Konneke in sod., 2005). Skoraj stehimetrična pretvorba NH_4^+ kot edinega vira energije v kulturi v NO_2^- , je potrdila da gre za oksidatorja amonija. Po dodatku organskih spojin je bila rast inhibirana, kar dokazuje kemoavtotrofno organizem (Konneke in sod., 2005). Najvišja dosežena koncentracija celic *N. maritimus* v kulturi je bila $1,4 \times 10^7$ celic /ml pri 28 °C, začetni koncentraciji NH_4^+ : 500 μM in generacijskim času 21 ur. Hitrost rasti izolirane arheje je bila 2x višja (0,78 /dan) od maksimalne izmerjene hitrosti v okoljskih vzorcih (0,3 /dan). Morfološka analiza z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa je pokazala prevlado paličastih od 0,17 do 0,2 μm širokih in do 1 μm dolgih celic, brez bička. Filogenetsko se arheja *N. maritimus*, tako kot večina morskih AOA, uvršča v nekdanjo skupino *Crenarhaeota* marine group I.1a, ki danes spada v novo deblo *Thaumarchaeota*. Na podlagi variabilnosti gena *amoA* pa se *N. maritimus* uvršča v klaster *Nitrosopumilus* (Pester in sod., 2012).

Kasneje so fiziologijo in kinetiko oksidacije NH_4^+ v kulturi arheje *N. maritimus* podrobneje opisal Martens-Habbena in sodelavci (2009). Pokazali so, da oksidacija amonija poteka v skladu z Michaelis-Mentlovim principom encimske kinetike, tako kot je značilno tudi za AOB. Rezultati so pokazali visoko afiniteto arheje *N. maritimus* za NH_4^+ ($K_m = 0,134 \mu\text{M}$). Najnižja koncentracija amonija pri kateri so še zaznali rast je bila <10 nM, kar je 100- krat manj kot najnižja koncentracija, pri kateri še rastejo AOB. Aktivnost oksidacije amonija v kulturi arheje *N. maritimus* je bila (51,9 $\mu\text{mol NH}_4^+/\text{mg proteina /h}$) približno enako visoka, kot aktivnost v kulturah AOB (30-80 $\mu\text{mol NH}_4^+/\text{mg proteina /h}$) (Martens-Habbena in sod., 2009).

Od prve izolacije AOA v čisti kulturi do danes, so raziskovalci v obogatenih kulturah pridobili še nekatere AOA iz različnih morskih okolij (Severno morje - obalni pas, morski sediment obalnega morja, odprto morje – Severno-vzhodni Tihi ocean (globine: 25, 75, 150 m)) (Wuchter in sod., 2006; Matsutani in sod., 2009; Santoro in Casciotti, 2011). V

vseh primerih je primerjava 16S rRNA genov pokazala visoko stopnjo sorodnosti z arhejo *N. maritimus* (98-99 %), razen v primeru AOA evfotičnega pasu odprtega morja Tihega oceana (globine: 25 in 75 m), kjer je bila podobnost na nivoju 16S rRNA genov z arhejo *N. maritimus* 92 % (Santoro in Casciotti, 2011). Iz sedimenta rečnega ustja je bila izolirana arheja *Ca. »Nitrosopumilus salaria«*, ki je prilagojena na rast v okolju z velikimi nihanji v slanosti. Njena podobnost z arhejo *N. maritimus* na 16S rRNA nivoju znaša 98 % (Mosier in sod., 2012b). Iz sedimentov v območju nizke slanosti je bila izolirana tudi AOA, ki ne sodi v rod *Nitrosopumilus*; *Ca. »Nitrosoarchaeum limnia«* (Mosier in sod., 2012a).

Zelo pomemben dosežek na področju raziskav oksidatorjev amonija predstavlja izolacija prve amonij-oksidirajoče arheje iz prsti - *Nitrososphaera viennensis*, ki so jo Tournu in sodelavci (2011) pridobili v čisti kulturi. Arheja se na podlagi gena 16S rRNA uvršča v Skupino I.1b, na podlagi gena *amoA* pa jo uvrščamo v klaster *Nitrososphaera* (Pester in sod., 2012). Kot že samo ime pove, gre za celice kokoidne oblike, optimalna temperatura za njeno rast pa je višja ($> 35^{\circ}\text{C}$), kot je v primeru arheje *N. maritimus* (30°C) (Martens-Habbena in sod., 2009; Tournu in sod., 2011). Kasneje je bila iz vzorca tal, natančneje iz rizosfere rastline *Caragana sinica*, v obogateni kulturi pridobljena tudi *Thaumarchaea Ca. »Nitrosoarchaeum koreensis«*, ki je evolucijsko bližje *Ca. »Nitrosoarchaeum limnia«*, kot *N. viennensis* (Kim in sod., 2011). Zelo pomembno tudi odkritje in obogatitev prve acidofilne talne AOA *Ca. »Nitrosotalea devanattera«*, saj kislota (pH $< 5,5$) predstavljajo $\sim 30\%$ kopnega in je nitrifikacija v takih tleh zelo intenzivna (Lehtovirta-Morley in sod., 2011). Ta se na podlagi gena *amoA* uvršča v povsem samostojen klaster - *Nitrosotalea* (Pester in sod., 2012).

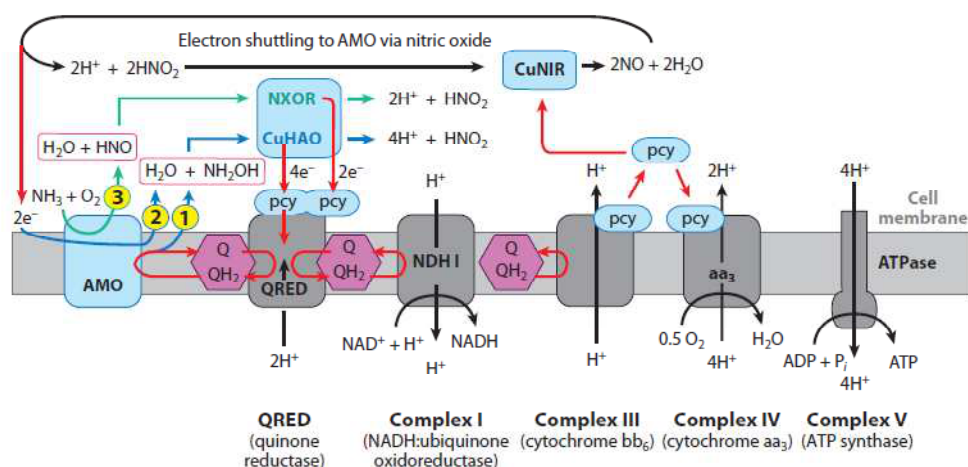
V visoko obogateni kulturi so bile vzgojene tudi nekatere termofilne AOA. Iz mikrobne preproge v Sibirskem vročem vrelcu Garga je bila izolirana zmerno termofilna arheja *Ca. »Nitrososphaera gargensis«*, ki se taksonomsko uvršča v arhejsko skupino I.1b, optimalna temperatura za njeno rast pa je 46°C (Hatzenpichler in sod., 2008). Iz vročega vrelca v parku Yellowstone pa so raziskovalci v obogateni kulturi izolirali *Ca. »Nitrosocaldus yellowstonii«*, katere optimalna temperatura za rast je med 65 in 71°C in jo uvrščamo v bolj oddaljen klaster - ThAOA oziroma HWCG-III (De La Torre in sod., 2008), po novem

imenovan klaster *Nitrosocaldus* (Pester in sod., 2012). Visoke optimalne temperature za rast termofilnih AOA, govorijo v prid teoriji o skupnem termofilnem predniku vseh AOA.

2.2.3.1 Genomske in metagenomske analize AOA

Razvoj visoko-zmogljivih metod sekvenciranja je omogočil določanje nukleotidnega zaporedja celotnih genomov arhej, ki še niso bile izolirane v čisti ali obogateni kulturi, kot na primer arheja *Cenarchaeum symbiosum*, ki živi v simbiozi z morsko spužvo vrste *Axinella mexicana* (Hallam in sod., 2006). Prav tako so danes znana zaporedja genomov večine obogatenih in v čisti kulturi izoliranih AOA. Primerjava genomskih zaporedij je pokazala, da fiksacija CO₂ pri AOA poteka s 3-hidroksipropionatnim ciklom, ki je sicer značilen za termofilne arheje iz rodu *Sulfolobus* (Hallam in sod., 2006). Z analizo genoma arheje *N. maritimus* SCM1, so potrdili kemoavtotrofni metabolizem in prisotnost 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutirat-ne poti fiksacije ogljika iz CO₂. Istočasno so zaznali tudi zaporedja genov za prevzem nekaterih organskih hranil (Walker in sod., 2010). Mehanizem oksidacije NH₄⁺ ter sama dihalna veriga se pri AOA razlikuje od mehanizma značilnega za AOB, mehanizem pridobivanja energije pa še ni popolnoma razjasnjen (Slika 2.6). Najpomembnejši encim je, tako kot pri AOB, amonij- monooksigenaza, vendar so genomske podatke pokazali da AOA ne vsebujejo nobenega drugega elementa, ki je prisoten pri AOB. Tako na primer homologa encima hidroksil-oksidge (HAO) pri AOA niso našli, zato predvidevajo, da NH₂OH ni produkt encima AMO. Razvila se je alternativna hipoteza, ki pravi da je vmesni produkt nitroksil (HNO) (Walker in sod., 2010; Stahl in De la Torre, 2012). Kljub temu pa je bila produkcija in poraba NH₂OH pri arheji *N. maritimus* nedavno dokazana z uporabo stabilnega izotopa ¹⁵N. To nakazuje, da je za oksidacijo NH₂OH odgovoren encim, ki ni homolog AOB encima - hidroksilamin oksidge (Vajrala in sod., 2013).

b AOA (*Nitrosopumilus maritimus*)



Slika 2.6: Predlagan potek oksidacije amonija pri arheji *Nitrosopumilus maritimus* po treh alternativnih poteh (povzeto po Stahl in De la Torre (2012)).

Predlagana pot (1) in (2) predvidevata, da je hidroksilamin (NH_2OH) produkt encima AMO pri oksidaciji NH_3 . Pot (1) predvideva vračanje dveh elektronov iz dihalne verige na AMO, kot pri AOB, oksidacijo NH_2OH pa opravlja Cu – vsebujoča hidroksilamin oksidoreduktaza (CuHAO). Pot (2) predvideva, da sta elektrona za iniciacijo oksidacije NH_3 pridobljena z oksidacijo NO, ki nastane z redukcijo NO_2^- z predlagano Cu- odvisno nitrit reduktazo (CuNIR). Pot (3) predvideva HNO kot vmesni produkt in njegovo oksidacijo z hipotetično nitroksil - oksidoreduktazo (NXOR).

Figure 2.6: Proposed pathway for ammonia oxidation in the AOA *Nitrosopumilus maritimus* following three alternative pathways (from Stahl & De la Torre (2012)).

In pathways (1) and (2), the immediate product of ammonia oxidation by the archaeal AMO would be hydroxylamine. According to pathway (1) two electrons would be recycled to AMO and the remaining two electrons would be transferred to the electron transport chain. Pathway (2) speculates that NO, produced by the reduction of nitrite by a proposed copper-dependent nitrite reductase (CuNIR), is the source of electrons for AMO. NH_2OH would be oxidized by copper hydroxylamine oxidoreductase (CuHAO). Pathway 3 represents a possibility that HNO is the product of the archaeal AMO and it would be oxidized to nitrite by a putative nitroxyl oxidoreductase (NXOR).

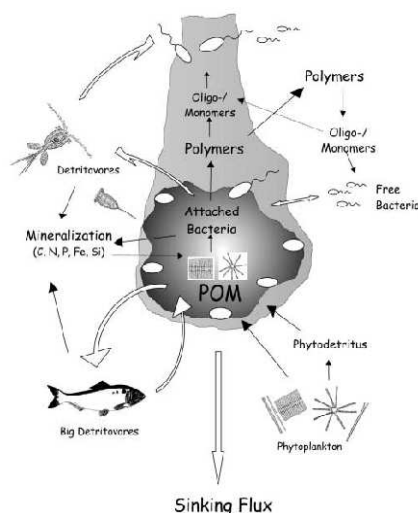
2.3 MORSKI SNEG IN MAKROAGREGATI

2.3.1 **Pojav morskega snega in njegov ekološki pomen v oceanih in priobalnih morjih**

Morski sneg (ang. marin snow) je običajen pojav v vseh morskih okoljih. Gre za makroskopske plavajoče delce partikulatne organske snovi (POM - particulate organic matter) velikosti od 500 μm do 1 cm ali več. Izvor in sestava delcev sta zelo različna, najpogosteje pa jih povezujemo s fitoplanktonskimi eksudati in razgradnjo fitoplanktonske biomase, kot najpomembnejšega izvora organske snovi v morju (Alldredge in Silver, 1988). Koncentracije morskega snega so višje v priobalnih morjih in v evfotičnem območju oceanov, kjer poteka primarna produkcija. Delci morskega snega v odprtih oligotrofnih morjih tonejo v mezopelagični in batipelagični pas, kjer predstavljajo pomemben vir organske snovi za heterotrofne mikroorganizme v globljih slojih, kjer v odsotnosti svetlobe organska snov nastaja le kemolitotrofno in so njene koncentracije nizke (Fowler in Knauer, 1986). Delci, ki se med tonjenjem ne razgradijo, se posedajo na oceansko dno. Tako prihaja do ponora organske snovi nastale s fotosintezo v površinskem sloju. Morski sneg igra pomembno vlogo pri biogeokemičnem kroženju elementov ter pri zniževanju koncentracije CO_2 v atmosferi (Fowler in Knauer, 1986; Kiørboe, 2001).

Delci morskega snega so pogosto obogateni z anorganskimi in organskimi spojinami in tako predstavljajo ugodna mikrookolja za rast mikrobnih združb. Koncentracije mikrobnih celic so običajno tudi do dva velikostna razreda višje kot v okolni vodi (Alldredge in Silver, 1988; Simon in sod., 2002). Poleg bakterijskih celic lahko na agregatih morskega snega najdemo tudi veliko število aktivnih fitoplanktonskih celic, nanoflagelatov, protozojev ter bakteriofagov (Simon in sod., 1990; Simon in sod., 2002). Bakterijska produkcija ogljika izmerjena v vzorcih morskega snega je skoraj vedno višja kot v okolni vodi, kar nakazuje na intenzivno rast heterotrofnih prokariontov, ki jo omogoča razgradnja v agregate vezane organske snovi (Alldredge in sod., 1986). Na podlagi bakterijske produkcije ogljika (BCP) izmerjene z asimilacijo 3H-levcina, so Simon in sodelavci (1990) izračunali, da je bakterijska potreba po organskem ogljiku na agregat morskega snega pritrjenih bakterij tako nizka, da bi za asimilacijo vse v agregat vezane organske snovi

bakterijska združba potrebovala več kot leto dni. Izmerjene povišane aktivnosti hidrolitičnih ekto- in ekso- celičnih encimov (proteaze, fosfataze, α in β -glukozidaze in hitinaze), pa nakazujejo, da se večina bakterijsko razgrajene organske snovi porazgubi v okolico agregata (Smith in sod., 1992). Delec morskega snega tako obdaja gradient raztopljenih organske snovi in anorganskih hranil, ki v njegovo okolico privabljajo gibljive kemotaktične bakterije. Na ta način združba na agregat vezanih bakterij podpira rast prostoživeče združbe v svoji okolici (Azam in Long, 2001; Kiørboe in Jackson, 2001; Stocker in sod., 2008) (Slika 2.7). Gradient raztopljenih hranil pa zaznavajo tudi nanoflagelatni predatorji, kar jim omogoča detekcijo večjih koncentracij bakterijskih celic. Bakteriovorni nanoflagelati kot tudi bakteriofagi z usmerjenim hranjenjem preoblikujejo bakterijsko združbo na agregatu (Caron, 1987; Fenchel in Blackburn, 1999; Kiørboe in sod., 2004).



Slika 2.7: Shematski prikaz procesov in poti mikrobne razgradnje na in v okolici makroskopskih agregatov. POM – partikulatna organska snov (povzeto po Simon in sod. (2002)).

Figure 2.7: Scheme of loss processes and microbial decomposition pathways of macroscopic organic aggregates. POM - Particulate organic matter (from Simon et al.(2002))

2.3.2 Pojavnost morskega snega in makroagregatov v Tržaškem zalivu

Morski sneg in večji organski agregati so v polzaprtih morjih Mediterana zelo pogost pojav. Za Severni Jadran in njegov najsevernejši del – Tržaški zaliv, so značilni pojavi zelo velikih sluznih agregatov, ki lahko v dolžino dosežejo tudi do nekaj metrov in zavzemajo različne oblike (Stachowitsch in sod., 1990; Turk in sod., 2010). Večji organski agregati se v Tržaškem zalivu pojavljajo predvsem konec pomladi in v poletnem obdobju, ko je vodni stolpec razslojen. Pojav je bil v Severnem Jadranu prvič omenjen leta 1729 in opisan kot »mare sporco« oziroma »umazano morje«, vendar pa je bolj pogosto dokumentiran v zadnjih 20 letih (Danovaro in sod., 2009). Pojav negativno vpliva na veje gospodarstva, ki so povezane z morjem, kot je ribištvo in turizem ter ima velik vpliv na ekološke procese v morju (Rinaldi in sod., 1995). V primerih ko se agregati usedejo na morsko dno, in se razgrajujejo, lahko pride do pomanjkanja kisika ter nastanka hipoksij in anoksij, kar negativno vpliva na bentoške organizme (Welker in Nichetto, 1996). Zaradi naštetih negativnih vplivov je raziskovanje nastanka in ekološke vloge tega pojava zelo pomembno (Giani in sod., 2005; Turk in sod., 2010).

Nastanek večjih sluznih agregatov, kot jih poznamo v Tržaškem zalivu je kompleksen proces, ki ni povsem pojasnjen. Razvilo se je nekaj hipotez o njihovem nastanku. Nanj naj bi vplivali tako biotski kot abiotski dejavniki. Nekateri avtorji, kot vzrok za pojav tako velikih sluznih agregatov, navajajo prekomerno namnožitev fitoplanktona. Več raziskav je namreč pokazalo, da fitoplankton, še posebej diatomeje, ob koncu rasti, ko se koncentracije hranil močno znižajo in fitoplanktonske celice preidejo v stacionarno fazo rasti, sproščajo v okolico velike količine eksopolisaharidnih substanc (EPS), ki se ob mirnih hidroloških pogojih povezujejo v večje agregate (Passow in sod., 1994; Obernosterer in Herndl, 1995). Problem razgradnje velikih količin organske snovi je verjetno pogojen z nizko koncentracijo fosfata in dušikovih anorganskih spojin, ki so se porabile med cvetenjem fitoplanktona. Delež C:N in C:P sta posledično previsoka za uspešno bakterijsko razgradnjo in asimilacijo organske snovi, kar imenujemo tudi »motnja v delovanju mikrobne zanke« ali »microbial loop malfunctioning« (Thingstad in sod., 1997; Lipizer in sod., 2011). Poleg tega je znano, da se morski sneg s starostjo siromaši tako da je vsebnost lahko-razgradljive POM vedno nižja in razmerje C:N ter C:P vedno višje (Obernosterer in

Herndl, 1995). K temu še dodatno pripomorejo bakterije s produkcijo težko-razgradljivih bakterijskih ovojnic, s katerimi se lažje pritrdijo na trdno podlago (Heissenberger in sod., 1996a).

K pojavu velikih agregatov pripomorejo tudi geografske in hidrološke posebnosti Tržaškega zaliva. Zaradi zaprtosti in plitkosti je vpliv rečnih pritokov in vnosa hranil s kopnega v morje tržaškega zaliva še posebej pomemben. V spomladanskem času se zaradi povečanega vnosa rek in alohtonih hranil s kopnega ter zaradi zvišanja temperature morja pojavi cvetenje fitoplanktona (Turk in sod., 2007; Mozetič in sod., 2012). Poleg tega se v poletnem času oblikuje poseben krožni tok, ki Tržaški zaliv izolira od južnejših morskih mas, ki se v hladnejših delih leta stekajo vanj in povečuje zadrževalni čas vode v zalivu (Supić in Orlić, 1999). Zaradi tega se v poletnem obdobju vzpostavi izrazita temperaturna razslojenost vodnega stolpa in mešanje vode med sloji zelo omejeno, kar pripomore k vzdrževanju nizkih koncentracij anorganskih hranil v slojih, kjer je bila rast fitoplanktona in heterotrofna razgradnja fitoplanktonskih izločkov zelo intenzivna. To onemogoča remineralizacijo organske snovi in povzroča njeno kopičenje v posameznem temperaturno-gostotnem sloju, kjer se ta združuje v večje strukture (Turk in sod., 2010).



Slika 2.8: Primer večjih agregatov morskega snega v Tržaškem zalivu ter način vzorčenja

Fotografiji sta bili posneta 26. 8. 2010 (fotograf: Tihomir Makovec)

Figure 2.8: An example of larger marine snow aggregates in the Gulf of Trieste and its sampling method

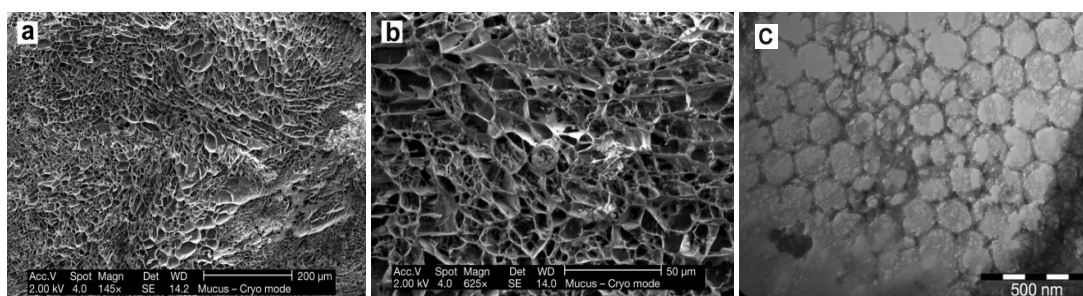
The photos were taken on 26. 8. 2010 (photografer: Tihomir Makovec)

Kemijske analize so pokazale, da večji del agregata predstavlja vodna faza (95 – 99 %) in v njej raztopljene organske in anorganske snovi. Preostali del (1- 5 % mase) predstavlja suha snov, ki sestoji iz 18 – 57 % organske snovi. V njej prevladujejo ogljikovi hidrati (79 %), medtem ko je proteinov manj (8 %), najmanj pa je lipidov (okoli 1 %) (Kovac in sod., 2004; Turk in sod., 2010).

2.3.3 Vloga in raznolikost prokariontske združbe na agregatih morskega snega

Procesi razgradnje in vloga bakterijske združbe pri razgradnji agregata so bili pogosto raziskani, medtem ko je manj znanega o vlogi bakterijske združbe pri nastanku agregatov. Razgradnja v agregat vezane organske snovi poteka s pomočjo bakterijskih ekso- in ekto-encimov, kar dokazujejo povišane aktivnosti hidrolitičnih encimov, kot so: aminopeptidaza, alkalna fosfataza, α - in β -glukozidaza, proteaze, lipaze, nukleaze in drugih, s katerimi bakterije učinkovito razgrajujejo organske polimere (Obenosterer in Herndl, 1995; Herndl in sod., 1999; Zoppini in sod., 2005). Poleg tega pa bakterije sodelujejo tudi pri samem nastanku agregata. Bakterije na agregatih sintetizirajo mnogo večje eksopolisaharidne ovojnice, kot jih opazimo pri pelagičnih bakterijah (Heissenberger in sod., 1996a). Obsežen polisaharidni sloj omogoča pritrdjanje bakterijskih celic na agregat, poleg tega pa je verjetno namenjen tudi zaščiti ekto- in ekso-encimov in deluje kot nekakšna »past« za raztopljene produkte hidrolize polimerov (Heissenberger in Herndl, 1994; Heissenberger in sod., 1996a; Heissenberger in sod., 1996b). Bakterijske polisaharidne kapsule so za nadaljnjo bakterijsko razgradnjo zelo odporne, kar še dodatno poveča koncentracije težko-razgradljivih komponent morskega snega (Heissenberger in sod., 1996a), ki se s starostjo agregata viša (Herndl in sod., 1999). Bakterijske celice, ki izločajo ekstracelularni matriks, bi lahko bile odgovorne za nastanek kompleksne tridimenzionalne strukture v obliki satovja, ki jo opazimo znotraj sluznih agregatov z uporabo elektronskega mikroskopa (Turk in sod., 2010). Zelo podobne strukture so namreč opazili v tekočih kulturah nekaterih sevov razširjenih bakterij, kot je na primer *Pseudomonas fluorescence* in *P. aeruginosa* (Schaudinn in sod., 2007; Baum in sod., 2009). Kakšna je funkcija takšnih tridimenzionalnih mrež ni še povsem znano, predvidevajo pa, da lahko predstavljajo komunikacijsko omrežje za prenos signalov med bakterijskimi celicami, transportne poti po katerih se celice premikajo ali celo »električno

omrežje» za prenos elektronov med celicami oziroma na trdne elektronske akceptorje (Schaudinn in sod., 2007). Ker so tvorbe takšnih struktur zmožne le nekatere vrste bakterij in ker predvidevajo, da je lastnost gensko pogojena, je poznavanje združbe bakterij, ki naseljuje agregate pomembno za boljše razumevanje nastanka večjih agregatov.



Slika 2.9: Elektronske mikrofografije sluznih agregatov iz Severnega Jadrana (30. junij 2004) (povzeto po Turk in sod. (2010)).

(a) in (b): Mikrografiji mukoznega matriksa agregata posneti z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Philips XL20) pri 145x in 625x, po obdelavi vzorca z metodo visokotlačnega zamrzovanja (Cryo SEM). (c): Mikrografija ultra tanke rezine mukoznega matriksa agregata posneta s presevnim elektronskim mikroskopom (Jeol 100 CX).

Figure 2.9: Electron microscopy images of the mucus aggregates from the northern Adriatic (30th June 2004) (from Turk et al. (2010)).

(a) and (b): micrographs of mucus matrix taken with scanning electron microscope (SEM: Philips XL20) at 145x in 625x magnification. Specimens were prepared using the high pressure freezing method (Cryo SEM). (C) Micrograph of ultra thin layers of mucus matrix taken with transmission electron microscope (Jeol 100 CX) Sheets of material at lower magnification. (b) The inner core of the mucus consisted of fibbers forming irregular network-like structures.

Taksonomska sestava bakterijske združbe na organskih agregatih iz Tržaškega zaliva je bila analizirana z majhnim številom analiziranih genov 16S rRNA, ko so bili postopki sekvenciranja še na začetku razvoja (Rath in sod., 1998). Raziskava je pokazala velik delež deltaproteobakterijskih celic (23 % populacije) ter približno enakovredne deleže bakteroidet, gamaproteobakterij in gram-pozitivnih bakterij (15.3 – 17 %). Danovaro in sodelavci (2009) pa so v vzorcih agregatov iz severozahodnega dela Jadranskega morja z metodo FISH odkrili velik delež vibrijev ter opazili večjo diverziteto celic na agregatu, v primerjavi z okolno vodo. Dosedanje raziskave so obravnavale večinoma bakterijske ne pa

tudi arhejske na agregat vezane združbe, ravno tako še ni bila raziskana združba nitrifikatorjev oziroma oksidatorjev amonija, ki se sprošča tekom aktivne heterotrofne razgradnje v agregat vezane organske snovi.

3 CILJI IN HIPOTEZE

Prvi cilj doktorskega dela je pridobiti vpogled v sezonsko dinamiko in strukturo združbe amonij- oksidirajočih arhej in bakterij v obalnem morju Tržaškega zaliva ter preučiti vpliv okoljskih dejavnikov na proces oksidacije amonija, kar bo pripomoglo k boljšemu razumevanju geokemijskega kroženja dušika v plitvem obalnem morju Tržaškem zalivu.

- Predvidevamo, da v območju Tržaškega zaliva prevladujejo amonij- oksidirajoče arheje (AOA) nad amonij- oksidirajočimi bakterijami (AOB).
- Predvidevamo, da poleg koncentracije dušikovih spojin na razporeditev in številčnost AOA in AOB vplivajo tudi drugi fizikalni, kemijski in biološki dejavniki.
- Predvidevamo, da se amonij- oksidirajoče arheje v vzorcih iz Tržaškega zaliva na podlagi variabilnosti gena *amoA* filogenetsko uvrščajo v podklast »morski vodni stolp« in sicer v skupino »plitvo-morskih« AOA (skupina A) in ne v skupino »globoko-morskih« AOA (skupina B).

Cilj dela je tudi izolacija AOA iz morske vode Tržaškega zaliva in gojenje v visoko obogateni oziroma čisti kulturi, ter določitev njenih fizioloških in biokemičnih lastnosti.

Drugi cilj doktorskega dela je raziskati bakterijsko in arhejsko združbo vezano na delce morskega snega in morskih agregatov, ki predstavljajo organsko bogato okolje za številne mikroorganizme in zaradi intenzivne remineralizacije organske snovi tudi potencialno življenjsko nišo za nitrifikacijsko združbo.

- Predvidevamo, da se bakterijske in arhejske združbe na agregatih zaradi specifičnih fizikalno kemijskih gradientov v agregatu, razlikujejo od prostoživečih združb.
- Predvidevamo, da obstaja razlika tako v številčnosti kot tudi v sestavi združbe amonij- oksidirajočih arhej in bakterij v primerjavi z okolno morsko vodo.

4 MATERIALI IN METODE

4.2 LETNA DINAMIKA AMONIJ-OKSIDIRAJOČIH ARHEJ IN BAKTERIJ

Razširjenost amonij-oksidirajočih arhej in bakterij smo spremljali na dveh globinah (5 m, 21 m) tekom enega leta. Njihovo vertikalno razporeditev pa smo preverili v dveh časovnih točkah (februar in julij), v odsotnosti in v prisotnosti vertikalne razslojenosti vodnega stolpca. Sezonske spremembe v sestavi združbe amonij-oksiderajočih arhej smo nadalje analizirali na podlagi variabilnosti gena *amoA* tekom leta.

4.2.1 Značilnosti Tržaškega zaliva

Tržaški zaliv je predel severovzhodnega Jadranskega morja. Zaradi njegove plitkosti (< 30 m), zaprtosti in številnih pritokov rek, ima ta del Jadrana specifične oceanografske lastnosti. Velik vpliv na te lastnosti imajo predvsem izmenjujoči se pretoki vodnih mas iz južnejših delov Jadrana, sladkovodni vnosi rek (glavni vnos predstavlja raka Soča/ Isonzo) ter meteorološki pojavi in značilnosti (Malačič in Petelin, 2001; Comici in Bussani, 2007; Zanchettin in sod., 2008; Malačič in sod., 2009). Značilna so velika sezonska nihanja slanosti (od 32,8 do 36,7 PSU) in temperature (od 9,2 °C pozimi do 25 °C poleti). V zimskem obdobju (od novembra do aprila) prevladuje homotermija ali enakomerna porazdelitev temperature po celotnem vodnem stolpcu. V času spomladanskega segrevanja pride do vzpostavitve vertikalne stratifikacije. Ta se stopnjuje do sredine poletja oziroma vse, dokler ne pride do vertikalnega mešanja vodnega stolpca (Malačič in Petelin, 2001). Na vsebnost anorganskih nutrienotv (NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-}) vpliva predvsem pogostost in količina vnosa sladke vode iz kopnega. Koncentracije tako sovpadajo s pretoki rek in količino padavin (Turk in sod., 2007). Sezonska nihanja okoljskih parametrov močno vplivajo na sestavo in aktivnost mikrobne združbe, na razširjenost posameznih skupin mikroorganizmov ter posledično na dinamiko razgradnje organske snovi in biogeokemijsko kroženje elementov.

4.2.2 Vzorčenje in obdelava vzorcev

Vzorčenje morske vode za analizo letne dinamike AOA in AOB je potekalo v obdobju od aprila 2010 do marca 2011. Vzorčenje smo izvajali enkrat mesečno v okviru rednih vzorčevanj za kontrolo kakovosti slovenskega morja. Vzorčevalno mesto 00BF se nahaja v neposredni bližini oceanografske boje VIDA ($45^{\circ} 32' 55,68''$ N, $13^{\circ} 33' 1,89''$ E; Slika 4.1). Vzorci morske vode so bili zajeti s 5-litrskimi Niskin posodami pritrjenimi na vzorčevalno rozeto (Sea-Bird SBE 32 Carousel Water Sampler). Rozeta je standardna oceanografska vzorčevalna naprava, ki omogoča vzorčenje do 12 vzorcev morske vode hkrati (tekem enega spusta v morje), globina zajema vzorcev je vnaprej računalniško določena in kontrolirana, kar zagotavlja zajemanje vzorcev vedno na isti globini. Tekom vzorčenja smo opravili meritve sledečih fizikalnih parametrov: temperatura, slanost, pH ter vsebnost raztopljenega kisika. Vzorce morske vode smo v roku ene ure od vzorčenja v temnih steklenih posodah transportirali v laboratorij, kjer je potekala takojšnja nadaljnja obdelava ter shranjevanje vzorcev.



Slika 4.1: Geografski položaj oceanografske boje Vida in hkrati položaj vzorčevalnega mesta 00BF

Vzorčevalno mesto 00BF se nahaja v neposredni bližini oceanografske boje Vide - označeno s polnim krogom.

Figure 4.1: Geographical location of oceanographic buoy Vida and sampling site 00BF at the same time.

Sampling site 00BF is located in close vicinity of oceanographic buoy Vida – denoted by filled circle.

Za namen izolacije DNA, smo 1 l morske vode filtrirali skozi polietersulfonski (PES) filter z velikostjo por 0,22 μm in premerom 47 mm (Pall corporation). V primerih, ko je zaradi visoke gostote celic filtracija potekala zelo počasi, kar bi lahko vplivalo na integriteto vzorca, smo volumen vzorca zmanjšali in zabeležili količino prefiltrirane vode. Filtre smo po končani filtraciji prenesli v krio-tubice in shranili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nadaljnje obdelave.

4.2.3 Določanje koncentracije nutrientov

Koncentracije sledečih nutrientov: nitrat (NO_3^-), nitrit (NO_2^-), amonij (NH_4^+), ortofosfat (PO_4^{3-}), raztopljeni O_2 so bile določene v vzorcih nefiltrirane morske vode po standardnih kolorimetričnih metodah (Grasshoff in sod., 1999). Celokupni fosfor (P_{tot}) in celokupni dušik (N_{tot}) predstavljata vsoto anorganskih N oziroma P vrst ter organsko vezanega N oziroma P.

4.2.4 Izolacija DNA

Celokupno DNA iz vzorcev morske vode smo izolirali po metodi opisani v Bostrom in sod.(2004) z nekaterimi modifikacijami. Za izolacijo DNA smo uporabili $\frac{1}{2}$ filtra ki smo ga po vzorčenju shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (poglavje 4.2.2).

V sterilni 2 ml mikrocentrifugirki smo s sterilnim rezilom razrezali filter na manjše dele ter dodali 525 μl predogretega ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) liznega pufru (400 mM NaCl, 750 mM saharoza, 20 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 9; pufer je bil steriliziran s filtracijo skozi 0,2 μm Millex filter enoto). Nato smo dodali 10,5 μl sveže pripravljene raztopine lizocima v končni koncentraciji 1mg/ml (50 mg/ml v 5 x TE pufru (50 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM EDTA)) ter inkubirali 30 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končani inkubaciji smo dodali 53,5 μl 10 % detergenta SDS (natrijev dodecil sulfat; steriliziran s filtracijo skozi 0,2 μm Millex® Syringe Filter Unit enoto (Millipore); končna koncentracija 1 %) in 3 μl proteinaze K (20 mg/ml v ddH₂O; končna koncentracija: 100 $\mu\text{g/ml}$). Mikrocentrifugirke smo dodatno zatesnili s parafilmom ter inkubirali pri $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noči (max 16h).

Po končani inkubaciji smo lizat prenesli v svežo 2 ml mikrocentrifugirko ter preostanke filtra sprali s 500 μ l 5x TE pufra. V obe mikrocentrifugirki (s koščki filtra in z lizatom) smo dodali enak volumen (1 V) že pripravljene mešanice fenol/kloroform/izoamilalkohol (25:24:1) ter temeljito premešali. S centrifugiranjem (20.000x g, 5 min) smo ločili vodno fazo od organske. Vodno fazo smo prenesli v svežo 2 ml mikrocentrifugirko in ponovili korak z mešanico fenol/kloroform/izoamilalkohol (25:24:1). Po centrifugiranju smo vodno fazo zopet prenesli v svežo 2 ml mikrocentrifugirko in dodali 1 V mešanice kloroform/izoamilalkohol (24:1) ter po temeljitem mešanju, ločili fazi s centrifugiranjem (20.000 x g , 5 min). Zgornjo- vodno fazo iz obeh mikrocentrifugirk smo združili v sveži mikrocentrifugirki, ter oborili DNA z dodatkom 1/10 V 3 M natrijevega acetata (Sigma), 0,6 V hladnega izopropanola (Sigma) in 3 μ l raztopine za obarjanje - GlycoBlue (Ambion) ter inkubirali 2 uri pri -20 °C. Po inkubaciji smo DNA sedimentirali s centrifugiranjem (4 °C, 20 min, 20.000 x g), previdno odstranili izopropanol ter pelet sprali z 500 μ l ledeno-hladnega 70 % etanola, po ponovnem centrifugiranju (4 °C, 20 min, 20000 x g) smo odstranili etanol in spiranje še enkrat ponovil. DNA smo posušili v vakuumskem sušilcu (10 min, 30 °C), raztopili v 50 μ l H₂O (Sigma) ogreje na 45 °C ter shranili pri -20 °C.

4.2.5 Določanje števila amonij-oksidirajočih arhej (AOA) in bakterij (AOB)

Sezonsko razširjenost AOA in AOB v morski vodi Tržaškega zaliva, smo določali posredno s kvantifikacijo arhejskega in bakterijskega *amoA* gena, ki kodirata α - podenoto encima amonij- monooksigenaze (AMO). Gen *amoA* smo kvantitativno določali z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času ali kvantitativno PCR (qPCR). Količino namnoženih produktov, ki je v eksponentni fazi pomnoževanja premosorazmerna s koncentracijo začetnega števila kopij tarčnega gena, smo spremljali s pomočjo reporterskega barvila Sybr Green (Invitrogen), ki se nespecifično veže na dvoverižno DNA. Število kopij gena *amoA* smo podali na mililiter morske vode.

Da bi preverili kakšna je korelacija med številom kopij arhejskega 16S rRNA gena in številom kopij arhejskega *amoA* gena, smo v vzorcih morske vode določili število kopij arhejskega 16S rRNA gena, specifičnega za *Taumarchaeota* Marine Group I (MGI). To razmerje nam pove kakšen delež vseh arhej vsebuje gen *amoA* in je zato potencialno

zmožen oksidacije amonija do nitrita oziroma koliko kopij gena *amoA* vsebuje posamezen arhejski genom.

4.2.5.1 Priprava plazmidnih standardov

Za namen kvantifikacije arhejskega in bakterijskega *amoA* gena ter gena MGI 16S rRNA smo pripravili plazmidne standarde na sledeči način:

Kot vir arhejskega *amoA* gena ter gena MGI 16S rRNA smo uporabili DNA izolirano iz vzorca morske vode atlantskega oceana odvzetega na globini 100 m, ki so nam ga posredovali kolegi iz Oddelka za morsko biologijo, Dunajske univerze. Kot vir betaproteobakterijskega *amoA* gena pa smo uporabili DNA izolirano iz aktivnega blata odvzetega v čistilni napravi mestne občine Piran. DNA je bila izolirana iz peleta 3 ml aktivnega blata, ki smo ga 2x sprali z 1,5 ml 1x PBS pufra. Uporabili smo zgoraj opisano metodo izolacije DNA (glej poglavje 4.2.4), vendar smo zaradi večje kompleksnosti matriksa dodali še korak razbijanja s kroglicami ali »bead-beating«. Razbijanje materiala je bilo izvedeno po končani encimski inkubaciji, v sklopu tretiranja ekstrakcijske mešanice z mešanico fenol/kloroform/izoamilalkohol (25:24:1).

- Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili posamezne gene. Reakcijska mešanica ($V=25\ \mu\text{l}$) je vsebovala: 16,28 μl H₂O (Sigma), 1x reakcijski pufer (Tris KCl, - MgCl₂; Fermentas), 3 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,25 mM dNTP mix (Fermentas), 0,032 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA (Fermentas), 0,2 μM vsakega začetnega oligonukleotida (Preglednica 4.1), 1 enoto Taq polimeraze ter 2 μl DNA (50-100 ng). Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji:

95 °C - 10 min	} 35 ciklov
94 °C – 30 s	
T naleganja* - 40 s	
72 °C – 1 min	
72 °C – 7 min	

*temperatura naleganja za posamezen par začetnih oligonukleotidov je podana v preglednici 1.

- Velikost PCR produktov smo preverili z gelsko elektroforezo. Produkta smo ločevali na 1,5 % agaroznem gelu (1,5 % agaroz (Sigma); 1 mg/ml etidijevega bromida) v 1x TAE pufru (Tris baza (4,84 g/l), ledocetna kislina (11,42 ml/l), EDTA (0,74 g/l)) pri napetosti 120 V, 30 minut. Za določitev velikosti PCR produktov smo uporabili velikostno lestvico 1 kb (Biotools).
- Sveže pomnožene PCR produkte ustreznih velikosti (Preglednica 4.1) smo vstavili v plazmidni vektor pCR[®]2.1 (Invitrogen) ter z njim transformirali kemijsko kompetentne celice One Shot[®] TOP10, ki so del kita TA Cloning kit (Invitrogen). Vse postopke smo izvedli v skladu z navodili proizvajalca. Transformirane celice smo gojili na trdnem LB gojišču z ampicilinom (100 µg/ml; LB-Amp), ki smo ga predhodno premazali s 40 µl 40 mg/ml raztopine X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indol-β-D-galactopiranosid, Sigma) pri 37 °C, preko noči. Plazmidno DNA smo nato izolirali iz 2 ml prekonočne (15 h, 37 °C) kulture v tekočem LB-Amp gojišču, ki smo jo pridobili iz posamezne bele kolonije. Pri tem smo uporabili kit za izolacijo plazmidne DNA (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) ter sledili postopku proizvajalca.
- Koncentracijo izolirane plazmidne DNA smo izmerili fluorometrično s pomočjo kita Quant-It[™] dsDNA HS Assay kit (Invitrogen). Pri tem smo sledili navodilom proizvajalca.
- Da bi zagotovili učinkovito naleganje začetnih oligonukleotidov ter pomnoževanje DNA standardov, smo plazmidno DNA linearizirali z encimom endonukleazo BsaI, ki reže ob nukleotidnem zaporedju GGTCTC, ki se nahaja na poziciji 2851 znotraj plazmidnega vektorja pCR[®]2.1. Restriksijska mešanica je vsebovala: 1x restriksijski pufer NEB4, 2 µl endonukleaze BsaI (20 U), 0,5 µl BSA BsaI (vse New England Biolabs), 150 - 200 ng plazmidne DNA ter do 50 µl H₂O (Sigma).

Reakcija je potekala pri 37 °C 5 h, nakar smo encim deaktivirali z inkubacijo pri 65 °C 20 min.

- Število kopij posameznega plazmidnega standarda smo določili z absolutno kvantifikacijo z metodo qPCR, pri čemer smo kot standard uporabili plazmidni vektor pCRTM2.1-TOPO® znane koncentracije (10 ng / μ l, kar ustreza $2,5 \times 10^9$ kopij/ml), ki je del kita za kloniranje TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) ter oligonukleotidne začetnike, ki specifično nalegajo na plazmidni vektor pCR®2.1-TOPO ter na vektor pCR®2.1 izven klonske regije (pCR21_2f: 5'-TGC CTG CTT GCC GAA TAT C-3' and pCR21_2r: 5'-CCA CAG TCG ATG AAT CCA GAA A-3') (Logar in sod., 2012). Reakcijska mešanica (20 μ l) je vsebovala 10 μ l 2x Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), 4,4 μ l PCR-grade H₂O (Sigma), 400 nM vsakega začetnega oligonukleotida in 4 μ l plazmidne DNA. Reakcija je potekala v aparaturi ABI prism 7900HT (Applied Biosystems) po sledečem inkubacijskem zaporedju:

50 °C - 2 min	
95 °C - 10 min	
95 °C – 15 s	} 40 ciklov
60 °C – 1 min	

Po končanem pomnoževanju smo z merjenjem zmanjševanja jakosti fluorescence med dvigom temperature vzorca iz 60 °C do 95 °C pridobili podatke za analizo talilnih krivulj (melting curve analysis), ki nam omogoča preverjanje specifičnosti pomnoževanja

Število kopij posameznega plazmidnega vektorja smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje 10-kratnih serijskih redčenj plazmida pCRTM2.1-TOPO®.

Za namen kvantifikacije posameznih genov v vzorcih morske vode smo pripravili redčitvene vrste plazmidnih standardov od 10^8 do 10^0 kopij na μ l.

4.2.5.2 Kvantifikacija genov *amoA* ter gena MGI -16S rRNA z metodo qPCR

Reakcija je potekala v 10 μ l reakcijski mešanici, ki je vsebovala: H₂O (Sigma) 1x Pico Max pufer (2 mM MgCl₂ Agilent Technologies), MgCl₂ (1 mM, Fermentas), BSA (0,4 μ g/ μ l, Fermentas), dNTP (0,25mM, Invitrogen), DNA polimerazo PicoMaxx (0,5 U, Agilent Technologies), 50.000 x redčen SYBR® Green I (Invitrogen), 0,4 mM vsakega od začetnih oligonukleotidov ter 2 μ l DNA izolirane iz vzorcev morske vode oziroma 2 μ l DNA redčitve plazmidnega standarda.

Z namenom, da bi se pri določanju števila kopij posameznega gena v posameznem vzorcu izognili napakam zaradi inhibicije pri pomnoževanju, smo pri analizi vsakega vzorca uporabili tri zaporedne redčitve DNA, od katerih je bila vsaka analizirana v dveh paralelkah. Medtem ko je bila posamezna redčitev standarda analizirana v treh paralelnih reakcijah. Reakcija je potekala v aparaturi LightCycler®480 (Roche) pod naslednjimi inkubacijski pogoji:

95 °C - 10 min	}	45 ciklov
95 °C – 30 s		
T naleganja* - 40 s		
72 °C – 30 s		
80 °C – 25s (merjenje fluorescence)	}	

*temperatura naleganja za posamezen par začetnih oligonukleotidov je podana v preglednici 1

Po končanem pomnoževanju je bila izvedena še analiza talilnih krivulj z merjenjem zmanjševanja jakosti fluorescence med dvigom temperature vzorca iz 60 °C do 95 °C, s pogostostjo merjenja fluorescence 5 / °C, pri hitrosti segrevanja 0,11 °C/s.

Preglednica 4.1: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov uporabljenih pri qPCR za kvantifikacijo arhejskih in bakterijskih genov *amoA* ter gena MGI – 16S rRNA

Navedena je tudi dolžina pomnoženega produkta in temperatura naleganja za posamezen par začetnih oligonukleotidov. Začetna nukleotida *amoA*-1F in *amoA*-r NEW specifično nalegata na betaproteobakterijski gen *amoA*.

Table 4.1: Nucleotide sequence of primers used in qPCR for *amoA* and MGI- 16S rRNA gene quantification.

Lengths of amplified PCR product and primer annealing temperature are also given for each pair of primers. Primer pair of *amoA*-1F and *amoA*-r NEW targets betaproteobacterial *amoA* gene.

Tarčni organizem	Tarčni gen	Ime	Dolžina pomnoženega fragmenta (bp)	Temperatura naleganja (°C)	Nukleotidno zaporedje (5' --> 3')	Vir
Marine Crenarchaeota Group I (MCGI)	16S rRNA	MCGI-391f	122	61	AAGGTTARTCCGAGTGRTTTC	Takai (2004)
		MCGI-554r			TGACCACTTGAGGTGCTG	Teira (2004)
AOA	<i>amoA</i>	Arch- <i>amoA</i> -for	256	59	CTGAYTGGGCYTGGACATC	Wuchter (2006)
		Arch- <i>amoA</i> -rev			TTCTTCTTTGTTGCCAGTA	Wuchter (2006)
AOB (beta-proteobakterije)	<i>amoA</i>	<i>amoA</i> -1F	490	61	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Rotthauwe (1997)
		<i>amoA</i> -r NEW			CCCCTCBGSAAAVCCTTCTTC	Hornek (2006)

4.2.6 Gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (DGGE; denaturing gradient gel electrophoresis)

DGGE je »fingerprinting« metoda, ki jo uporabljamo za določanje pestrosti in sprememb v sestavi mikrobnih združb. Metoda omogoča ločevanje molekul DNA enake velikosti (s PCR pomnoženi del določenega gena) glede na njihovo nukleotidno sestavo. Ločevanje temelji na elektroforetski mobilnosti delno razprtih DNA vijačnic v poliakrilamidnem gelu, ki je v primerjavi z dvovijačno obliko DNA slabša. Razprtje verig DNA poteka med potovanjem DNA fragmentov iz manjše v območje z večjo koncentracijo DNA denuranta. Potovanje molekul v gelu se popolnoma ustavi, ko sta verigi dvojne DNA dovolj razpreti, kar pa je odvisno od nukleotidne sestave posameznega fragmenta (Muyzer in sod., 1993).

S to metodo smo želeli preveriti kakšna je struktura arhejske združbe amonij-oksidirajočih arhej in kako se le ta spreminja tekom leta. Kot markerski gen smo izbrali gen *amoA* ter spremljali pojavnost različnih genotipov tega gena tekom enega leta na globinah 5 in 21 m. Za primerjavo smo dodali tudi vzorec DNA iz Atlantskega oceana (100 m).

4.2.6.1 Pomnoževanje arhejskega gena *amoA* za ločevanje z DGGE

Arhejski *amoA* gen smo pomnožili z metodo PCR pri čemer smo uporabili en začetni nukleotid z dodanim GC repom – to je zaporedje ponavljajočih se GC nukleotidov dolgo 40 nt, ki preprečuje, da bi se DNA verigi v gradientu denaturanta popolnoma razprli in tako prešli iz gela kot enojna DNA veriga.

Reakcijska mešanica za pomnoževanje arhejskega *amoA* gena ($V = 50\ \mu\text{l}$) je vsebovala: 1x Pico Max pufer (2 mM MgCl_2 , Agilent Technologies), MgCl_2 (1mM, Fermentas), BSA (0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Fermentas), dNTP (0,25mM, Invitrogen), DNA polimerazo PicoMaxx (0,5 U, Agilent Technologies), 0,4 mM začetnega oligonukleotida Arch-*amoA*-for (Preglednica 4.1), 0,4 mM začetnega oligonukleotida Arch-*amoA*-rev_GC (5' - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G TTC TTC TTT GTY GCC CAR TA - 3') ter 2 μl produkta qPCR. Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji:

95 °C - 10 min; začetna denaturacija,	
94 °C – 30 s	} 35 ciklov
58,5 °C - 40 s	
72 °C – 40 min	
72 °C – 7 min	

Velikost produktov je bila preverjena z gelsko elektroforezo. Ker se je poleg želenega produkta velikosti 296 bp pojavljal še en fragment velikosti nekaj pod 100 bp, smo fragment želene velikosti izrezali in izolirali iz gela s pomočjo kita za čiščenje Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen) ter DNA eluirali v 50 μl oziroma 30 μl elucijskega pufra, glede na količino produkta (ocenjeno iz jakosti lise na gelu). Koncentracijo prečiščenih

produktov smo izmerili fluorimetrično s kitom Quant-It™ dsDNA HS Assay (Invitrogen).

4.2.6.2 Priprava poliakrilamidnega denaturacijskega gela in potek ločevanja genov *amoA*

8 % poliakrilamidni gel smo izdelali s pomočjo gradientnega mešala v katerega smo vlili 11,5 ml 10 in 50 % denaturacijske raztopine (Preglednica 4.2), v katere smo tik pred tem dodali 115 µl 10 % raztopine amonijevega persulfata (APS) in 11,5 µl raztopine TEMED (Sigma).

Preglednica 4.2: Sestava denaturacijskih raztopin za izdelavo poliakrilamidnega gela za analizo DGGE AOA združbe.

Table 4.2: Composition of denaturing solutions used in preparation of polyacrylamide gel for DGGE analysis of AOA community.

	10 % denaturacijska razt.	50 % denaturacijska razt.
50X TAE pufer	1 ml	1 ml
Poliakrilamid 40 %; (akrilamid : bis-akrilamid 37,5:1)	10 ml	10 ml
Formamide	2 ml	10 ml
Urea	2,1 g	10,5 g
ddH ₂ O	do 50 ml	do 50 ml

Polimerizacija gela je trajala 90 do 120 min pri sobni temperaturi, nakar smo v jamice na vrhu gela nanесли od 300 do 500 ng očiščenega PCR produkta skupaj z nanašalnim barvilom (10 µl). Gel smo nato priključili na elektrode ter položili v DGGE-kopel s predogretim (60 °C) 1 x TAE pufrom. Ločevanje je potekalo pri 200 V (35-40 mA), 60 °C, 4'5 h.

Po končanem ločevanju smo DNA fragmente obarvali z barvilom SybrGold (Invitrogen), tako da smo na gel nanесли in enakomerno razporedili 27,5 ml 10x redčenega barvila v 1X

TE pufru ter v popolni temi inkubirali 30 min. Gel smo nato pregledali in fotografirali s pomočjo UV transluminatorja BioDocAnalyze Gel documentation system (Biometra).

Fotografije gelov smo obdelali z računalniškim programom GelCompare (Applied Maths), pri čemer smo bodili matriko prisotnosti posameznih fragmentov v posameznih vzorcih. To smo nato vnesli v program Primer 6 (v.6.1.7, PRIMER-E Ltd), kjer smo za izračun podobnosti med različnimi vzorci uporabili Jaccardov koeficient podobnosti. Na podlagi podobnostne matrike smo vzorce razvrstili v skupine s hirahično metodo »group average« ter tako generirali dendrogram združb AOA na 5 ter na 21 m.

4.2.6.3 Izdelava knjižnic arhejskega gena *amoA* in obdelava sekvenc

Da bi bolj podrobno raziskali sezonske variacije v združbi arhejskih amonij-oksidatorjev ter preverili sezonske spremembe v sestavi združbe, ki smo jo zaznali z metodo DGGE, smo izbrali 4 vzorce morske vode iz globine 21 m za izdelavo knjižnic arhejskega *amoA* gena.

Z metodo PCR smo pomnožili celoten arhejski *amoA* gen (632 bp) z začetnimi oligonukleotidi *amo_F* (5'-ATG GTC TGG CTA AGA CGM TGT A) (Hallam in sod., 2006) in *amoAR* (5'-GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT) (Francis in sod., 2005). Reakcijska mešanica (V=50 µl) je vsbovala: 32,2 µl H₂O (Sigma), 1x reakcijski pufer (Tris KCl, - MgCl₂), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix, 0,4 µg/µl BSA (vse Fermentas), 0,2 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 2 enoti Taq polimeraze (Fermentas), ter 2 µl DNA (50-100 ng). Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji:

95 °C - 4 min	}	35 ciklov
94 °C – 1 min		
55 °C - 1 min		
72 °C – 1min		
72 °C – 15 min		

Sveže pomnožene fragmente smo klonirali z uporabo kita za kloniranje TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) in pri tem sledili navodilom proizvajalca. Bakterijske kolonije, ki so vsebovale plazmid z vstavljenim fragmentom smo precepili na trdno LB-Amp gojišče v jamicah mikrotitrne rastne ploščice (96 jamic/ ploščo) ter tako pripravljene genske knjižnice poslali na sekvenciranje v podjetje GATC Biotech (Nemčija). Nukleotidno zaporedje je bilo določeno z uporabo univerzalnega začetnega oligonukleotida M13-FP (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'), ki nalega na plazmidni vektor.

Dele sekvenc, ki niso ustrezali standardom kvalitete, smo odstranili s programom DNA-Baser (poizkusna verzija v3). S pomočjo spletnega orodja Decrease redundancy (ExPASy) smo sekvence razporedili v avtonomne taksonomske enote (OTU) na podlagi 98 % podobnosti. S programom MEGA5 smo nato pripravili filogenetsko drevo s po eno sekvenco na OTU. Drevo smo zasnovali z metodo združevanja sosedov (angl. Neighbour joining method) ter ga grafično opremili s spletnim orodjem iTOL (interactive Tree Of Life, (Letunic in Bork, 2007)).

4.3 PESTROST ARHEJSKE IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V MORSKEM SNEGU IN VEČJIH ORGANSKIH AGREGATIH

4.3.1 Vzorčenje in obdelava vzorcev

Vzorčenje morskega snega in organskih makroagregatov je, ravno tako kot vzorčenje morske vode za določanje dinamike nitrifikatorjev (glej poglavje 4.2.2), potekalo na standardnem vzorčevalnem mestu 00BF, ki se nahaja v neposredni bližini oceanografske boje VIDA (Slika 4.1). Vzorce morskega snega in makroagregatov so potapljači odvzeli s sterilno 60 ml siringo, ob pojavu le teh v obdobju od decembra 2009 do avgusta 2010. Vzorce morske vode smo zajeli na isti globini kot organske partikle (med 7 in 13 m) po zgoraj opisanem postopku (glej poglavje 4.2.2). Tekom vzorčenja smo vzorce organskih partiklov shranili v hladilno torbo ter jih v roku 1 ure prenesli v laboratorij, kjer je potekala nadaljnja obdelava.

Organski partikli, ki so bili vzorčeni s siringo so nam služili za karakterizacijo mikrobne združbe, ki je povezana z organskimi delci, medtem ko nam je morska voda služila za karakterizacijo prostoživečih mikrobnih združb.

Za namen štetja celic pod mikroskopom smo vzorce morske vode in morskega snega fiksirali z paraformaldehidom (PFA) v končni koncentracij 2-3 %, ki smo ga predhodne sterilizirali s filtracijo skozi filter z velikostjo por 0,2 μm .

Za molekularne analize smo vse vzorce filtrirali pri nizkem vakuumskem tlaku (200 mbar) na 0,22 μm polikarbonatni filter (GTTP, Millipore) premera 47 mm ter po filtraciji filter nemudoma zamrznili, tako da smo mikrocentrifugirko v katero smo položili filter potopili v tekoči dušik in shranili pri -80 °C do nadaljnje obdelave.

4.3.2 CARD-FISH

Po fiksaciji s PFA, ki je potekala pri 4 °C v temi 8-18 h, smo s pomočjo vakuumske črpalke (200 mBar) filtrirali 1-10 ml fiksiranih vzorcev na polikarbonatni filter (GTTP, 0,2 μm , d=25 mm, Millipore) pod katerega smo vstavili podporni nitrocelulozni filter (HAWP,

0,45 μm , $d=25\text{mm}$, Millipore). Po končani filtraciji smo filter posušili in do nadaljnje obdelave shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Postopek CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization) je bil izveden, kot je opisano v Teira in sod. (2004). Filtre smo obdali s 0,1 % agaroznim gelom, posušili (10 min $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter izrezali po en delček (rezino) filtra za vsako od preiskovanih mikrobnih skupin. Da smo zagotovili permeabilizacijo celične stene bakterij smo celice na filtru inkubirali 1 h pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ z lizocimom (10 mg/ml v 0,1 M Tris-HCl in 0,05 M EDTA) oziroma s proteinazoK (10,9 mg/ml v 0,1 M Tris-HCl in 0,05 M EDTA), za permeabilizacijo arhejske celične stene. Po inkubaciji smo rezine filtrov sprali 3x v ddH₂O, 20-25 min v 0,01 M HCl, ponovno 2x v ddH₂O ter v 95 % etanolu. Rezine filtrov smo nato hibridizirali pri $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ v temi 10- 15 ur z oligonukleotidno sondo na katero je vezana hrenova peroksidaza (horseradish peroxidase, HRP). Končna koncentracija posamezne sonde v hibridizacijskem pufru (Priloga A) je znašala 2,5 ng/ μl . Za detekcijo bakterijskih celic smo uporabili mešanico Eub338 sond (Eub338-I: Eub338-II: Eub338-III =1:1:1), za detekcijo arhejskih celic smo uporabili mešanico sonde Cren537 in sonde Cren554 v razmerju 1:1, za detekcijo celic skupine *Euryarchaeota* smo uporabili sondo Eury806 (Preglednica 4.3). Rezine filtrov smo po hibridizaciji spirali v pufru za spiranje (Priloga A) 15 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter nato tretirali z 0,05 % raztopino tritona X-100 v 1xPBS pufru 15 min pri sobni temperaturi v temi. Nato je sledilo pomnoževanje signala z inkubacijo rezin filtrov s tiramid-Alexa488 v amplifikacijskem pufru (Priloga A) v volumskem razmerju 1:100 do 45 min pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v temi. Rezine filtrov smo nato spirali v 1xPBS pufru z dodatkom Triton X-100 (0,05 %), nato v ddH₂O in končno v 95 % etanolu. Nakar smo rezine filtrov posušili ter inkubirali v raztopini barvila 4',6-diamidino-2-phenilindolu (DAPI, 1 $\mu\text{g/ml}$), 3 min na ledu v temi. Tako smo označili vse v vzorcu prisotne prokariontske celice. Rezine filtrov smo sprali z ddH₂O in 95 % etanolom ter posušili.

Suhe rezine filtrov smo nato položili na objektno steklo ter prekrili z $\sim 50\text{ }\mu\text{l}$ mešanice za vklapljanje filtra in boljšo obstojnost fluorescence: 1xPBS-Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) - Glycerol (v PBS, Citiflour Ltd.) v volumskem razmerju 0,5:1:5,5 ter prekrili s krovnim stekelcem.

Preglednica 4.3: Nukleotidno zaporedje sond za označevanje bakterijskih, arhejskih in *Euryarchaea* celic v postopku CARD-FISH

Table 4.3: Sequence of *Bacteria*, *Crenarchaea* and *Euryarchaea* - specific probes for CARD-FISH hybridization.

Tarčni organizem	Ime	Nukleotidno zaporedje (5' --> 3')	Vir
Bakterije	Eub338 I	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann in sod. (1990)
	Eub338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Daims in sod. (1999)
	Eub338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Daims in sod. (1999)
Krenarheje	Cren537	TGA CCA CTT GAG GTG CTG	Teira in sod. (2004)
	Cren554 (GI554)	TTA GGC CCA ATA ATC MTC CT	Massana in sod. (1997)
<i>Euryarchaea</i>	Eury806	CAC AGC GTT TAC ACC TAG	Teira in sod. (2004)

Po označevanju celic z metodo CARD-FISH smo DAPI – obarvane in Alexa-pozitivne celice smo opazovali ter šteli pod epifluorescentnim mikroskopom Zeiss Axio Imager.A2m, ki je opremljen z 100 W Hg žarnico in ustreznimi filtri, ki prepuščajo emisijski fluorescenčni signal barvil DAPI (461 nm) in Alexa488 (519 nm). Število celic smo določali kot povprečje celic na ~10 vidnih poljih, pri čemer smo na vidnem polju izbrali del števnega polja z določeno velikostjo, tako da je ta vseboval ~100 DAPI pozitivnih celic ter upoštevali velikost izbranega polja pri izračunu. Končni rezultat smo preračunali na število posameznih celic na ml kulture.

4.3.3 Izolacija DNA/RNA

Za izolacijo DNA/RNA smo uporabili fenol-kloroform metodo, ki pa se rahlo razlikuje od zgoraj opisane metode za izolacijo DNA iz vzorcev morske vode (glej poglavje 4.2.4). Filtre smo s sterilnimi škarjami razrezali na majhne koščke in inkubirali v liznem pufu (10 mM Tris-HCL; pH 8, 25 mM Na₂EDTA; pH 8, 100 mM NaCl) z dodatkom lizocima (končna koncentracija: 1 mg/ml) 30 min pri 37 °C. Nato smo dodali natrijev dodecil sulfat (SDS; 1 % končna koncentracija) in proteinazo K (končna koncentracija: 100 µg /ml) ter inkubirali pri 55 °C 1 h. Nato smo dodali 1,5 do 2 g cirkonijevih kroglic in horizontalno stresali na največji hitrosti stresalnika Vortex-Genie® 2 (Mo-Bio) 10 min. Mešanico smo nato inkubirali pri 70 °C 30 min. Lizat smo v posameznih korakih tretirali z 3 ml fenola

(pH 7,9), 3 ml mešanice fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1) ter 3 ml kloroforma. Med posameznimi koraki ekstrakcije z organskimi topili smo ločili faze s centrifugiranjem pri 5000 obr/min 10 min. Nukleinske kisline smo nato precipitirali z 2x količino 100 % etanola in 0,02x količino 5M NaCl, pri -20 °C 1-2 h ter sprali z ohlajenim 70 % etanolom. Pelet smo posušili pri odprti centrifugirki in ga raztopili v 100 µl H₂O (DNase/RNase free water, Sigma) pri +4 °C preko noči ter shranili pri -80 °C.

Iz podvzorca DNA/RNA smo s pomočjo DNazne reakcije odstranili DNA in tako osamili RNA. Pri tem smo uporabili smo kit Deoxyribonuclease I, amplification grade (Invitrogen). Reakcijska mešanica je vsebovala: 1 µl 10x DNase I reakcijskega pufra, 1U DNase I Amp Grade encima in 8 µl DNA/RNA podvzorca. Inkubacija je potekala pri 37 °C 30 min, nakar smo encim deaktivirali z dodatkom 1 µl 25 mM EDTA (pH 8.0) in inkubacijo pri 65 °C 10 min. V vseh RNA vzorcih smo nato preverili morebitno DNA kontaminacijo tako da smo s PCR pomnoževali bakterijski 16S rRNA gen po spodaj opisanem postopku (glej poglavje 4.3.5). Vzorce RNA, kjer do pomnoževanja ni prišlo smo uporabili za prepis RNA v cDNA (copy DNA) v reakciji z reverzno transkriptazo. Vzorce, pri katerih smo opazili pozitiven rezultat, smo ponovno tretirali z DNazo in ponovno preverili čistost RNA.

4.3.4 Priprava cDNA

Iz 6 µl RNA smo s pomočjo reverzne transkriptaze sintetizirali cDNA. Uporabili smo kit za reverzno transkripcijo Superscript III First-Strand Synthesis supermix (Invitrogen), pri tem smo sledili navodilom proizvajalca.

4.3.5 T-RFLP fingerprinting bakterijske združbe

Sestavo bakterijske združbe v organskih partiklih in okolni vodi smo v vseh časovnih točkah preiskovali s pomočjo fingerprinting metode polimorfizma dolžine terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP; termial restriction fragment lenght polimorfism). Analiza sestoji iz naslednjih osnovnih korakov:

- Pomnoževanje bakterijskega 16S rRNA gena z začetnimi oligonukleotidi, ki so označeni s fluorescentnim barvilom
- Čiščenje pomnoženih fragmentov
- Rezanje z endonukleazo
- Ločevanje in detekcija terminalnih fragmentov po principu kapilarne elektroforeze v sekvenčniku.

Bakterijske 16S rRNA gene smo pomnožili z začetnim oligonukleotidom 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), označenim s fluorescenčnim barvilom FAM (6-karboksi-fluorescein) ter z začetnim oligonukleotidom 1492R (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), označenim z barvilom VIC. Reakcijska mešanica (50 µl) je vsebovala: 2 µl DNA oziroma 4 µl cDNA, 0,5 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov, 2 U Taq polimeraze, 1x Taq pufer (oboje Fermentas), 160 µM vsakega od dNTP (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 0,4 mg/ml BSA (Fermentas) ter H₂O (Sigma) do končnega volumna. Reakcija je potekala pod naslednjimi pogoji:

95 °C - 4 min	} 35 ciklov
95 °C - 40 s	
55 °C - 30 s	
72 °C - 1,5 min	
72 °C - 7 min	

Dolžino PCR produktov smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu. PCR fragmente smo po elektroforetskem ločevanju (90 V, 35 min) barvali z 2000x redčeno raztopino SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen), v temi 30 min.

Odvečne nukleotide ter začetne oligonukleotide smo iz reakcij, ki so vsebovale fragment ustrezne velikosti (~ 1500 bp) odstranili s PCRExtract Mini Kit (5Prime) pri čemer smo sledili navodilom proizvajalca. V primerih pojava dodatnih - nespecifičnih fragmentov ali dimerov začetnih oligonukleotidov, smo fragment prave velikosti izrezali iz gela ter prečistili z uporabo kita Agrose Gelextract Mini Kit (5Prime). Koncentracijo čiščenih

produktov smo nato preverili spektrofotometrično z aparaturo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Fluorescentno označene PCR fragmente smo nato rezali pri 37 °C 12 h z endonukleazo HhaI, ki reže znotraj zaporedja 5'-GCGC-3'. 20 µl restrikcijska reakcija je vsebovala 6U encima HhaI (NE BioLabs), 1x NE pufer4, 0,1 mg/ml BSA ter 100 ng očiščenega PCR produkta. Po inkubaciji smo encim deaktivirali pri 65 °C 20 min.

Alikvotu (1,5 µl) restrikcijske reakcije smo dodali 10 µl Hi-Di formamida in 0,3 µl internega velikostnega standarda 1200 LIZ (Applied Biosystems) ter denaturirali pri 95 °C 3 min. Ločevanje in detekcija fluorescentno označenih končnih fragmentov je potekala s sekvenčnikom 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) v 50 cm kapilari napolnjeni s POP7 polimerom (Applied Biosystems).

T-RFLP elektroferograme smo analizirali z računalniškim programom GelComparII (Applied Maths). S pomočjo internega standarda smo izravnali zamike med fragmenti različnih vzorcev, ki so nastali zaradi različne hitrosti potovanja fragmentov skozi polimer v različnih vzorcih. Velikosti fragmentov smo nato določili s pomočjo primerjave vrhov FAM in VIC barvil z vrhovi internega standarda znane velikosti. Prisotnost in odsotnost posameznih vrhov v različnih vzorcih smo uporabili za izdelavo +/- matrike, ki smo jo v programu Primer 6 (*PRIMER-E Ltd*) pretvorili v podobnostno matriko na podlagi Jaccardovega koeficienta podobnosti. Na podlagi podobnostne matrike smo vzorce razvrstili v skupine s hierarhično metodo »group average« ter tako generirali dendrogram bakterijskih združb. Z analizo nMDS (non-Metric Multidimensional Scaling) (Kruskal, 1964b, a) smo ocenili podobnost bakterijskih združb med vzorci. Ta redukcijska metoda prikaže oddaljenost/podobnost med posameznimi vzorci z zmanjševanjem primerjav med vzorci iz večdimenzionalnega prostora na 2 ali 3 dimenzijski prostor (grafikon). Vzorci katerih bakterijske združbe so si bolj podobne se v dvo-dimenzionalnem prostoru nahajajo bližje skupaj. Statistično značilnost opažene podobnosti med vzorci ter vpliv letnega časa oziroma izvora na sestavo združbe smo testirali s statistično metodo ANOSIM.

Zaradi neučinkovitega pomnoževanja arhejskega 16S rRNA gena s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, arhejske združbe nismo mogli analizirati s pomočjo metode tRFLP.

4.3.6 Izdelava 16S rRNA in 16S rDNA genskih knjižnic

Genske knjižnice arhejskih in bakterijskih 16S rRNA genov (16S rDNA) smo izdelali iz vzorcev vzorčenih pozno jeseni – pozimi (10. december 2009) ter iz poletnih vzorcev (26. avgust 2010). Poleg knjižnic 16S rDNA smo naredili tudi knjižnice 16S rRNA transkriptov (16S rRNA) v vzorcih morske vode (v vzorcih organskih partiklov količina rRNA ni bila zadostna za tovrstno analizo), da bi določili sestavo metabolno aktivne bakterijske združbe. Za pripravo knjižnic smo z metodo PCR pomnožili bakterijske 16S rRNA gene in 16S rRNA transkripte ter arhejske 16S rRNA gene. Reakcija je potekala pod enakimi reakcijskimi pogoji kot za tRFLP (glej poglavje 4.3.5) z nekaterimi spremembami: čas naleganje začetnih oligonukleotidov – 40 s, čas podaljševanja DNA verige – 2 min. Za pomnoževanje bakterijskih genov smo uporabili par univerzalnih začetnih oligonukleotidov 27F /1492R (glej poglavje 4.3.5), za pomnoževanje arhejskih genov pa par 21F (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA) in 958 R (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T).

Uspešnost pomnoževanja (prisotnost fragmentov pravih velikosti ~ 1500 bp za bakterijski gen in ~ 850 bp za arhejski 16S rRNA gen) smo preverili z elektroforezo na 1,5 % agaroznem gelu. Nakar smo združili vsebino 2 do 3 reakcij iz istega vzorca in jih očistili s kitom PCRExtract Mini Kit (5Prime) ter eluirali v 50 µl H₂O (Sigma). Čiščenim PCR produktom smo preventivno dodali adeninske repe na 3' koncu, v kolikor je prišlo do njihovega razpada med zamrzovanjem, odmrzovanjem in čiščenjem pomnožkov. Pri tem smo 10 µl PCR produkta inkubirali z 0,2 mM dATP, 1X Taq polimeraznega pufra, 1U Taq polimeraze in 1,5 mM MgCl₂ (vse Fermentas) v končnem volumnu 25 µl pri 72 °C 20 min.

PCR produkte (2-4 µl) smo nato klonirali v plazmidni vektor pCRII TOPO iz kita TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) upoštevajoč navodila proizvajalca. 2 µl klonske reakcije smo nato uporabili za transformacijo kemijsko kompetentnih celic OneShot TOP10 (Invitrogen), po navodilu proizvajalca (glej poglavje 4.2.5.1). Do 192 belih kolonij na vzorec smo po transformaciji prenesli v tekoče LB gojišče z 10 % glicerolom in ampicilinom v končni koncentraciji 100 µg/ml. Celice smo gojili čez noč pri 37 °C in

stresanju 180 rpm. Tako pripravljene genske knjižnice smo poslali na sekvenciranje v MacroGen sequencing service (Nederland). Za sekvenciranje smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida 27F (za bakterijske gene) ter 21F (za arhejske gene).

4.3.7 Filogenestka in statistična obdelava podatkov

Dele sekvenc, ki niso ustrezali standardom kvalitete smo odstranili s poizkusno verzijo programa DNA Baser v. 3.0. ter preverili prisotnost kimer s programoma Mallard v.1.02 ter Pintail v.1.0. Sekvence smo primerjali (blast) s sekvencami v podatkovni bazi SILVA (Pruesse in sod., 2007) ter jih taksonomsko klasificirali, kot kriterij za ustreznost sekvenc smo izbrali mejo 97 % podobnosti s sekvencami iz baze podatkov. Reprezentativnost vzorčenja smo določili s prosto dostopnim programom MOTHUR (Schloss in sod., 2009). Pri čemur smo kot mejo za oblikovanje operativnih taksonomskih enot (OTU) določili 97 % podobnost med sekvencami. Na podlagi tega kriterija smo tudi grupirali sekvence v OTU-je s prosto dostopnim orodjem Decrease redundancy (ExPASy).

S pomočjo programov MOTHUR in Primer6 smo na podlagi dobljenih 16S rRNA/rDNA sekvenc izračunali sledeče kazalce vrstne diverzitete: Chao kazalec predvidene diverzitete (Chao1), Margalefov kazalec pestrosti (D), Shannon-Wiener kazalec vrstne diverzitete H' ter Pieloujev kazalec enakomernosti vrstne razporeditve (J'). Chao kazalec predvidene diverzitete nam pove kakšna bi bila diverziteteta - število vrst v danem vzorcu pri neskončnem vzorčenju - v našem primeru pri neskončnem številu sekvenciranih genov 16S rRNA. Margalefov kazalec vrstne pestrosti podaja število vrst (v našem primeru OTU) glede na število analiziranih sekvenc, medtem ko Shannon-Wiener kazalec vrstne diverzitete H' upošteva tudi enakomernost razporeditev posameznih sekvenc po OTU enotah, ki ga sicer podamo s torej Pieloujevim kazalcem enakomernosti vrstne razporeditve. Večji kot je J' bolj enakomerno so sekvence, torej bakterije/arheje razporejene v OTU enote ter večji kot je H' večja je diverziteteta.

Za konstrukcijo filogenetskih dreves smo iz vsake OTU izbrali po eno sekvenco ter najbolj sorodne sekvence iz podatkovne baze SILVA ter vse sekvence poravnali in v programu MEGA5. Po metodi združevanja sosedov (angl. Neighbor-Joining method) smo izdelali

filogenetska drevesa pri čemer smo evolucijske razdalje med sekvencami izračunali po Jukes-Cantor modelu. Reprezentativnost grupiranja sekvenc v filogenetskem drevesu smo preverili s testom bootstrap s 1000 ponovitvami. Drevo smo naknadno grafično obdelali ter dopolnili s številom sekvenc v posamezni OTU ki izvirajo iz posameznega vzorca. Uporabili smo prostodostopno spletno orodje iTOL (Interactive Tree of life) (Letunic in Bork, 2007). Na podlagi filogenetskih razmerij med posameznimi sekvencami smo nato opravili UniFrac analizo podobnosti med združbami v posameznem vzorcu z uporabo statističnega spletnega orodja UniFrac (Lozupone in sod., 2006).

4.4 IZOLACIJA AMONIJ- OKSIDIRAJOČE ARHEJE

Z namenom, da bi preučili potek nitrifikacije in genomske značilnosti morskih amonij-oksidirajočih arhej in tako dobili boljši vpogled v fiziologijo in evolucijo teh še ne povsem raziskanih mikroorganizmov, smo skušali v čisti kulturi izolirati predstavnika AOA. Uporabili smo več različnih gojišč, ki smo jih v prvem poizkusu inokulirali z vzorcem organskih agregatov, ki se v Tržaškem zalivu pojavljajo v poletnih mesecih, v drugem poizkusu pa z morskovo vodo, ki smo jo vzorčili v neposredni bližini Morske biološke postaje v Piranu v mesecu novembru in decembru.

4.4.1 Vzpostavitev obogatenih kultur AOA

4.4.1.1 Obogatena kultura AOA iz organskih makroagregatov

- Makroagregate je 26. avgusta 2010 s sterilno siringo vzorčil potapljač na globini 13 m. Vsebinsko vzorca makroagregatov smo nacepili v gojišče za nitrifikatorje MAM (Marine AO Medium; Preglednica 4.4) v razmerju:
- 10 ml vzorca + 300 ml gojišča - vzorec: PAR10
- 100 ml vzorca + 300 ml gojišča – vzorec: PAR100

Preglednica 4.4: Sestava gojišča MAM za bogatitev združbe nitrifikatorjev iz morskih okolij.

Table 4.4: Composition of MAM medium used for enrichment of nitrifying community from marine environments.

Spojina	količina na 1l gojišča	koncentracija v gojišču
(NH ₄) ₂ SO ₄	500 mg	3,8 mM
CaCl ₂	13,4 mg	117 µM
MgSO ₄ *7H ₂ O	400 mg	1,6 mM
KH ₂ PO ₄	105 mg	772 µM
raztopina keliranega FeSO ₄ (18,3 mM FeSO ₄)	1 ml	18,3 µM
morska voda (filtrirana skozi GF/F filter)	750 ml	
ddH ₂ O	250 ml	
pH ~7,3 (umirjeno z 0,5M NaCO ₃)		

Inkubacija je potekala v sterilnih 500 ml erlenmajericah zaprtih z zamaškom iz vate v temi, med stresanjem (200 rpm/min) pri 17 °C. Razvoj nitrifikacijske združbe smo spremljali z merjenjem koncentracije $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ ter koncentracije NH_4^+ z uporabo standardnih kolorimetričnih metod (Grasshoff in sod., 1999).

4.4.1.2 Vzpostavitev obogatene kulture AOA iz morske vode

Vzorci morske vode za vzpostavitev obogatene kulture smo odvzeli v obalnem pasu morja pred Morsko biološko postajo v Piranu, novembra in decembra 2011.

Z 10 ml morske vode smo Inokulirali 90 ml modificiranega gojišča SCM z 1mM koncentracijo NH_4Cl (Preglednica 4.4). Vzpostavili smo dve obogateni kulturi AOA (kultura z oznako **N25** – iz novembrskega vzorca in kultura z oznako **V25** iz decembrskega vzorca morske vode)

Gojenje obogatene kulture in njena nadaljnja bogatitev je potekala v zaprtih steklenicah napolnjenih približno do $\frac{1}{2}$, ki smo jih pred tem namakali 1 % raztopini HCl, 3x sprali z ddH₂O in avtoklavirali. Kasneje smo kulturo vzdrževali v sterilnih polietilenskih gojitvenih posodah za enkratno uporabo napolnjenih do $\frac{2}{3}$. Inkubacija je potekala v temi brez stresanja. V času vzpostavljanja obogatene kulture smo vsako od kultur gojili pri dveh različnih temperaturah (17 in 25 °C).

Bogatitev nitrifikatorjev smo spremljali z merjenjem porabe NH_4^+ v gojišču. Kulturo pri kateri smo zaznali upad koncentracije NH_4Cl od začetne (~1,1 mM) na 500 -700 μM NH_4Cl , približno dva meseca po inokulaciji smo kulturo testirali na prisotnost arhejskega gena *amoA* z metodo qPCR (glej poglavje 4.2.5.2) oziroma smo prisotnost arhejskih celic preverili pod epifluorescentnim mikroskopom tako da smo arhejske celice selektivno fluorescentno označili z metodo CARD-FISH (glej poglavje 4.3.2). V kolikor je bila vsebnost arhejskega *amoA* gena/arhejskih celic potrjena in je njihova koncentracija tekom bogatitvenega postopka opazno narasla, smo takšno kulturo precepili v sveže gojišče in ponovno spremljali njeno rast.

Preglednica 4.5: Sestava modificiranega gojišča SCM z dodatkom morske vode v koncentraciji 5 % ter sestava osnovnih raztopin za pripravo le tega.

Table 4.5: Composition of modified SCM medium containing 5 % of seawater and composition of solutions for its preparation.

Modificirano SCM gojišče (1 l)		
Osnovna raztopina soli	930	ml
HEPES Pufer (1M HEPES, 0,6M NaOH)	10	ml
NaHCO ₃ (1 M)	2	ml
KH ₂ PO ₄ (0,4 g/L)	5	ml
FeNaEDTA raztopina (7,5 mM)	1	ml
Modificirana mešanica elementov v sledovih	1	ml
NH ₄ Cl (1 M)	1	ml
sterilizirana morska voda (filtrirana skozi filter z velikostjo por 0,45 µm)	50	ml
Osnovna raztopina soli (1 l)		
NaCl	26	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	5	g
MgCl ₂ 6H ₂ O	5	g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,5	g
KBr	0,1	g
ddH ₂ O	do 1	l
Modificirana mešanica elementov v sledovih (1 l)		
ddH ₂ O	987	ml
HCl (konc. ~12,5 M)	8	ml
H ₃ BO ₃	30	mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	100	mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	190	mg
NiCl ₂ 6H ₂ O	24	mg
CuCl ₂ 2H ₂ O	2	mg
ZnSO ₄ 7H ₂ O	144	mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	36	mg

Vse raztopine so bile sterilizirane z avtoklaviranjem. pH medija smo posredno uravnali s pufrom HEPES na 7,5-7,6.

4.4.1.3 Vzdrževanje obogatene kulture AOA

Obogateno kulturo AOA smo vzdrževali s precepljanjem kulture v sveže pripravljeno gojišče, ko je koncentracija NH_4^+ padla na 1/3 začetne koncentracije (200-300 μM , če je bila začetna koncentracija 1 mM). V sveže gojišče smo nacepili 10 % inokulum predhodne kulture. Manjši inokulumi se niso izkazali kot uspešni, saj se je končni odstotek AOA v logaritemski fazi rasti zmanjšal hkrati pa se je povečal odstotek bakterijskih celic.

4.4.1.4 Določanje koncentracije nutrientov

Rast amonij-oksidirajočih arhej v obogateni kulturi smo spremljali s pomočjo merjenja koncentracije nutrientov. Kot je bilo to pokazano v primeru arheje *Nitrosopumilus maritimus*, AOA v čisti kulturi skoraj stehiometrično pretvarja NH_4^+ v NO_2^- , tako nam spremljanje teh dveh nutrientov omogoča spremljanje rasti AOA. V kolikor bi bile v kulturi prisotne bakterije ki oksidirajo NO_2^- do NO_3^- , bi prišlo do kopičenja slednjega pri porabi NH_4^+ . To bi se lahko dogajalo sploh v začetni fazi bogatitve, ko je pestrost mikrobne združbe v kulturi večja. Zato smo v začetni fazi spremljali tudi koncentracijo NO_3^- .

Določanje koncentracije amonija in amonijevega iona (NH_3 in NH_4^+)

Za merjenje amonija smo uporabili kolorimetrično izpeljanko metode z OPA (Holmes in sod., 1999), pri čemer smo koncentracijo vzorca izračunali na podlagi umeritvene krivulje, ki smo jo pridobili z analizo približno 8 serijskih redčenj 1,5mM NH_4Cl v SCM gojišču brez NH_4Cl in morske vode, s tem smo zagotovili enake kemijske pogoje kot v vzorcu.

Določanje koncentracije nitrata (NO_3^-)

Določanje koncentracije NO_3^- smo izvajali v začetnih fazi bogatitve, kjer so bile še vedno prisotne tudi bakterije, ki oksidirajo NO_2^- do NO_3^- , tako smo se prepričali, da nitrifikacija v kulturah resnično poteka in da upad koncentracije amonija ni posledica asimilacije le tega. Pri tem smo uporabili metodo, ki temelji na redukciji NO_3^- v prisotnosti vanadijevega klorida (VCl_3) in detekcije NO_2^- z Griess-ovim reagentom (Miranda in sod., 2001). Absorpcijo nastalega barvnega produkta smo merili pri valovni dolžini 540 nm. Koncentracijo NO_3^- v vzorcih smo določili na podlagi umeritvene krivulje, pridobljene z

analizo serijskih redčitev 100 μM kalijevega klorida (KNO_3) v SCM gojišču brez NH_4Cl in morske vode

Določanje koncentracije nitrita (NO_2^-)

Koncentracijo NO_2^- smo določali z Griess-ovim reagentom (N-1-naftiletildiamin dihidroklorid v kisli raztopini (fosforna kislina)), ki reagira z NO_2^- pri nizkem pH, pri čemer se tvori obarvan kompleks, z maksimalno absorpcijo pri 545 nm. Za pripravo umeritvene krivulje smo analizirali serijske redčitve 1 mM natrijevega nitrita (NaNO_2) v SCM gojišču brez NH_4Cl in morske vode.

4.4.1.5 Izolacija DNA in kvantifikacija gena *amoA*

Celokupno DNA obogatene kulture smo izolirali iz 1 ml kulture v pozni logaritemski fazi rasti (NH_4^+ : 200-300 μM). Celice smo pred tem sedimentirali s centrifugiranjem pri 10000g 10 min ter odstranili 850 μl supernatanta. Pelet smo shranili pri -20°C do izolacije DNA, ki je potekala po zgoraj opisani metodi (glej poglavje 4.2.4).

4.4.1.6 Določanje čistosti kulture z metodo CARD-FISH

Tekom postopka bogatitve smo uspešnost le te spremljali z določanjem deleža arhejskih in bakterijskih celic. Z metodo CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization) smo celice označili s oligonukleotidnimi sondami, ki specifično nalegajo na molekule 16S rRNA tarčne skupine ter njihovo število določili s štetjem pod epifluorescentnim mikroskopom.

Celice iz obogatene kulture (0,5 – 1 ml) smo fiksirali s paraformaldehidom (PFA) ali s formaldehidom v končna koncentracija 2 %, ki smo ga sterilizirali s filtracijo skozi filter z velikostjo por 0,2 μm . Fiksacija je potekala pri 4°C v temi 8-18 h. Nato smo s pomočjo vakuumske črpalke (200 mBar) filtrirali 0,5 – 2 ml fiksirane kulture na polikarbonatni filter (GTTP, 0,2 μm , d=25 mm, Millipore) pod katerega smo vstavili podporni nitrocelulozni filter (HAWP, 0,45 μm , d=25 mm, Millipore). Po končani filtraciji smo filter posušili in do nadaljnje obdelave shranili pri -20°C . Postopek hibridizacije CARD-FISH in štetje bakterij pod mikroskopom je potekalo kot je opisano v poglavju 4.3.2

4.4.2 Kloniranje gena 16S rRNA in gena *amoA* ter filogenetska analiza

Filogenetsko identiteto AOA v obogateni kulturi smo določali z analizo gena 16S rRNA ter gena *amoA*. Oba gena smo pomnožili z metodo PCR. Gen *amoA* smo pomnožili kot opisano v poglavju 4.2.6.3. Gen 16S rRNA smo pomnožili pri enakih pogojih le da smo čas podaljševanja DNA verige podaljšali na 2 min in uporabili začetna oligonukleotida 21F (5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3') in 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'). Pomnožene fragmente smo klonirali v plazmidni vektor in z njim transformirali kompetentne celice, po zgoraj opisanem postopku (poglavje 4.2.6.3). Pri sekvenciranju genov smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida M13-FP (5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') in M13-RP (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'). Sekvence smo obdelali s poizkusno verzijo programa DNA-Baser. Nato smo jih s pomočjo spletnega orodja Decrease Redundancy (ExPASy- Bioinformatics Resource Portal; <http://www.expasy.org/>) sortirali v skupine (OTU) na osnovi 98 % podobnosti. Te smo s pomočjo programa MEGA5 umestili v filogenetsko drevo po metodi združevanja sosedov (angl. Neighbour – Joining method), ki je temeljila na Tamura-Nei modelu. Drevo smo grafično obdelali s spletnim orodjem iTOL (Interactive Tree of Life; <http://itol.embl.de/index.shtml>; (Letunic in Bork, 2007)).

4.4.3 Test delovanja antibiotikov

Da bi odstotek arhejskih celic v obogateni kulturi povečali in zavrli rast bakterijskih celic smo testirali delovanje različnih antibiotikov v koncentraciji 100 µg/ml. Delovanje antibiotikov smo preverjali z zmožnostjo oksidacije NH_4^+ in količino nastalega NO_2^- , ter z mikroskopskim opazovanjem in štetjem po barvanju z metodo CARD-FISH (glej poglavje 4.3.2).

Izmed antibiotikov, katerih delovanje temelji na inhibiciji sinteze proteinov smo testirali streptomycin, kanamicin, eritromicin in tetraciklin. Izmed antibiotikov, ki zavirajo izgradnjo bakterijske celične stene pa smo testirali ampicilin in karbenicilin.

4.4.4 Potrjevanje prisotnosti AOB v kulturi

Da bi se prepričali ali proces oksidacije amonija v obogateni kulturi opravljajo izključno AOA, smo preverili prisotnost betaproteobakterijskega *amoA* gena z metodo PCR. Pomnoževanje je potekalo, kot je opisano v poglavju 4.2.5.2. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili plazmid z vstavljenim betaproteobakterijskim *amoA* genom (glej poglavje 4.2.5.1) Prisotnost oziroma odsotnost *amoA* gena smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu.

4.4.5 Določanje optimalnih pogojev za rast (temperatura in pH)

Da bi določili optimalne pogoje za rast kulture AOA smo spremljali porast NO_2^- pri različnih pH vrednostih gojišča (6'5, 7, 7'5, 8, 8'5) in različnih temperaturah (17, 20, 25, 30, 37 °C). Vse teste smo izvedli v treh paralelkah kulture. Generacijski čas smo določili iz naklona krivulje, ki podaja log-transformirano količino nastalega NO_2^- v odvisnosti od časa v eksponentni fazi rasti. Optimalno temperaturo in pH vrednost smo nato odčitali iz najnižje točke grafa, ki podaja generacijski čas v odvisnosti od temperature oziroma pH vrednosti.

4.4.6 Izdelava rastne krivulje

Za določitev generacijskega časa in hitrosti rasti arheje v kulturi smo izdelali rastno krivuljo v dveh 100 ml paralelah kulture. Vzorčenje smo izvedli vsak dan približno ob istem času. V podvzorcih smo določali vrednost naslednjih parametrov: NH_4^+ , NO_2^- , število vseh mikrobnih celic smo določali s pretočno citometrijo, medtem ko smo število AOA v določili s pomočjo ocenjevanja števila kopij arhejskega *amoA* gena, po zgoraj opisanem postopku (glej poglavje 4.2.5). Število bakterijskih celic v kulturi smo določali s kvantifikacijo bakterijskega 16S rRNA gena z metodo qPCR. Pri tem smo uporabili par začetnih oligonukleotidov GM3F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG C-3'); EUB338 (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'). Kot standard smo uporabili 350 bp-dolg produkt PCR pridobljen z istimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo ga prečistili s pomočjo kita PCRExtract Mini Kit (5Prime) ter njegovo koncentracijo izmerili spektrofotometrično z aparaturo NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Iz koncentracije produkta PCR smo na podlagi specifične mase pomnoženega odseka izračunali število kopij ampikona v ml standarda.

Reakcija je potekala v 10 µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala: H₂O (Sigma) 1x KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems), 0,5 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov ter 2 µl DNA izolirane iz vzorcev kulture oziroma 2 µl DNA redčitve PCR standarda. Reakcija je potekala pri sledečih pogojih :

95 °C - 10 min	}	50 ciklov
95 °C – 10 s		
55 °C - 20 s		
72 °C – 10 s		
80 °C – 3 s (merjenje fluorescence)		

Po končanem pomnoževanju je bila izvedena še analiza talilnih krivulj z merjenjem zmanjševanja jakosti fluorescence med dvigom temperature vzorca iz 60 °C do 95 °C, s pogostostjo merjenja fluorescence 5 / °C, pri hitrosti segrevanja 0,11 °C/s.

Hitrost rasti arheje (µ) smo izračunali po spodaj navedeni enačbi (1)

$$\mu = \frac{(\log N_t - \log N_0)}{0,301 \cdot t} \quad \dots (1)$$

kjer so μ konstanta hitrosti rasti, N_0 število celic oziroma kopij gena *amoA* na začetki eksponentne faze rasti, N_t je število celic oziroma kopij gena *amoA* na koncu eksponentne faze rasti in t čas med izbranimi točkama logaritemske faze rasti. 0,301 je pretvornik iz naravnega v desetiški logaritem.

Generacijski čas smo izračunali po enačbi (2)

$$t_{gen} = \frac{1}{\mu} \quad \dots (2)$$

Kjer je t_{gen} generacijski oziroma podvojevalni čas in μ konstanta hitrosti rasti.

Hitrost oksidacije amonija smo izračunali po enačbi (3)

$$\text{Hitrost oksidacije } NH_4^+ = \frac{[NO_2^-]_{t_1} - [NO_2^-]_{t_0}}{\frac{N_{t_1} + N_{t_0}}{2} \cdot (t_1 - t_0)} \quad \dots (3)$$

Kjer je $[NO_2^-]_{t_0}$ koncentracija nitrita ob času t_0 , N_{t_0} število celic v času t_0 , $[NO_2^-]_{t_1}$ in N_{t_1} pa koncentracija nitrita in število celic v času t_1 , pri čemer so t_0 in t_1 časovni točki znotraj logaritemske faze rasti celic.

4.4.7 Opazovanje celične morfologije s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM)

Priprava vzorca za opazovanje morfologije arhejskih celic v obogateni kulturi je vključevala fiksacijo celic, nanos celic na trdno podlago (filter), spiranje, dehidracijo celic, sušenje, postavitve na nosilec in prekrivanje površine z visoko prevodno snovjo - kovino. Vsi naštetih koraki morajo biti izvedeni zelo pazljivo, da med procesom ne pride do deformacije celic. Da bi preprečili kontaminacijo opazovanega vzorca z naključnimi okoljskimi bakterijami smo vse raztopine, ki so bile uporabljene pri pripravi preparata predhodno filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,22 μm .

Za fiksacijo celic smo uporabili dva različna načina:

1. 5 ml obogatene kulture v pozni logaritemski fazi rasti ($\sim 8 \cdot 10^7$ celic/ml) smo fiksirali z glutaraldehydom v končni koncentraciji 2-3 %, ter inkubirali 2-4 h, pri 4 °C v temi. S pomočjo vakuumske črpalke smo kulturo pod nizkim tlakom (< 200 mbar) filtrirali skozi polikarbonatni filter z velikostjo por 0,22 μm in premerom 25 mm, pod katerega smo podložili podporni polikarbonatni filter z velikostjo por 0,45 μm , da smo zagotovili enakomerno razporeditev celic po površini filtra. Celice smo nato 3x sprali tako da smo preko filtra filtrirali 10 ml sterilnega SCM medija.
2. 3 ml obogatene kulture v pozni logaritemski fazi rasti smo fiksirali s 7 ml kakodilatnim fiksacijskim pufrom (2,5 ml 0,4 M kakodilatni pufer ((CH_3)₂AsO₂Na 3H₂O), 0,23 g NaCl, 0,8 ml 25 % glutaraldehyd, do 10 ml ddH₂O; pH 7,5), ter inkubirali 2-4 h, pri 4 °C v temi. Fiksirano kulturo smo prenesli na filter na enak

način kot pri 1 načinu ter s filtracijo celice 3x sprali z 10 ml kakodilatnega pufru za spiranje (12,5 ml 0,4 M kakodilatni pufer, 1,25 g NaCl, 1 ml 0,4 M HCl, do 50 ml ddH₂O; pH 7,5).

Celice smo nato dehidrirali s spiranjem filtra z naraščajočo koncentracijo etanola (30, 50, 70, 95, 100 % - 15 ml vsake redčine). Tlak vakuumske filtracije smo uravnali, tako da je vsaka raztopina za prehod preko filtra potrebovala približno 5 min. Dehidracijski korak s 100 % etanolom smo ponovili 3x, nato pa dodali raztopino etanola in HMDS v razmerju 1:1, inkubirali 10 min in filtrirali skozi filter. V zadnjem korak smo celice ujele na filtru dokončno dehidrirali z 3x inkubacijo z HMDS. Po odstranitvi spojine HMDS smo filtre posušili na zraku, ter shranili pri sobni temperaturi do nadaljnje obdelave.

Delček filtra smo nato pritrdili na kovinski nosilec in nanj naperili tanko plast zlata. Nosilec smo nato prenesli v aparaturo SEM ter po vzpostavitvi vakuuma začeli s pregledom vzorca.

5 REZULTATI

5.2 AMONIJ-OKSIDIRAJOČE ARHEJE IN BAKTERIJE V OBALNIH VODAH TRŽAŠKEGA ZALIVA

Časovno in prostorsko razporeditev AOA in β AOB v morski vodi Tržaškega zaliva, smo določali posredno s kvantifikacijo arhejskega in bakterijskega *amoA* gena, ki kodirata α -podenoto encima amonij- monooksigenaze (AMO). Gen *amoA* smo kvantitativno določali z metodo qPCR in koncentracije primerjali z razporeditvijo hranilnih snovi. Spremembe v sestavi združbe AOA smo spremljali sezonsko na dveh globinah z metodo denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE) na osnovi sekvenc gena *amoA* ter z analizo genskih knjižnic gena *amoA* v pridnenem sloju.

5.2.1 Letna dinamika AOA in β AOB v površinskem in pridnenem sloju ter vpliv fizikalno-kemijskih dejavnikov na njihovo porazdelitev

5.2.1.1 Letna dinamika fizikalno – kemijskih parametrov

Temperaturne in slanostne razmere v enoletnem obdobju (april 2010 – marec 2011) niso odstopale od dolgoletnih meritev značilnih za Tržaški zaliv. V površinskem sloju je temperatura variirala od 10 do 28,3 °C in je bila najvišja julija, najnižja pa v obdobju januar – marec. V pridnenem sloju so bila nihanja temperature manjša (od 10 do 19 °C), z najvišjo izmerjeno vrednostjo v septembru in najnižjo v marcu. Koncentracije slanosti so v plitvem, polzaprtim zalivu odvisne predvsem od vremenskih pogojev in sladkovodnih vnosov, zato so tudi nihanja najvišja v površinskem sloju (od 31 – 38 PSU), v pridnenem sloju pa so koncentracije bolj konstantne preko celega leta (36 -38 PSU).

Koncentracije nitrata (NO_3^-) so v površinskem sloju sovpadale z nižjo slanostjo (Slika 5.1-B in C), kar nakazuje na vnos NO_3^- s pritoki rek. Višje koncentracije so se pojavljale junija in julija (4,5 in 4,6 $\mu\text{mol/l}$), ko je bila slanost najnižja (31,4 PSU). Najnižjo koncentracijo NO_3^- smo izmerili avgusta, v jesenskih mesecih je koncentracija naraščala do najvišje izmerjene vrednosti v novembru (9,1 $\mu\text{mol/l}$). V zimskem obdobju pa se je koncentracija postopoma zniževala. Podobno dinamiko NO_3^- smo zaznali v pridnenem sloju, le da so bile

izmerjene koncentracije na tej globini nižje (od 2,13 do 6,3 $\mu\text{mol/l}$). Koncentracije amonija (NH_4^+) so bile tako v površinskem kot tudi v pridnenem sloju višje v toplejših mesecih (april – september) in nižje v hladnejšem delu leta (oktober – marec). Poleg tega so bile mesečne koncentracije NH_4^+ v pridnenem sloju od 1,2- do 7,2- krat višje kot v površinskem sloju (Slika 5.2-B). V površinskem sloju je koncentracija NH_4^+ nihala od 0,04 (februar) do 1,8 $\mu\text{mol/l}$ (avgust) (Slika 5.1-B), v pridnenem sloju pa od 0,28 $\mu\text{mol/l}$ (oktober) do 3,6 $\mu\text{mol/l}$ (julij). Koncentracije nitrita (NO_2^-) so se tekom leta spreminjale podobno kot koncentracije NO_3^- , le da so bile od 3 do 22-krat višje v površinskem sloju ter od 1 do 9-krat nižje v pridnenem sloju (Slika 5.1-B, Slika 5.2-B). V obeh slojih tako zaznamo naraščanje koncentracije NO_2^- v jesenskih mesecih z viškom novembra (površinski sloj: 1,2 $\mu\text{mol/l}$; pridneni sloj: 2,4 $\mu\text{mol/l}$). Koncentracije ortofosfata (PO_4^{3-}) so bile nizke tekom celega leta (0,02-0,54 $\mu\text{mol/l}$). V površinskem sloju se je koncentracija PO_4^{3-} dvignila nad 0,1 $\mu\text{mol/l}$ le v obdobjih nizke slanosti (julij, september, november in december). Zelo podobne so bile tudi dinamika in vrednosti PO_4^{3-} v pridnenem sloju (Priloga C1 in C2).

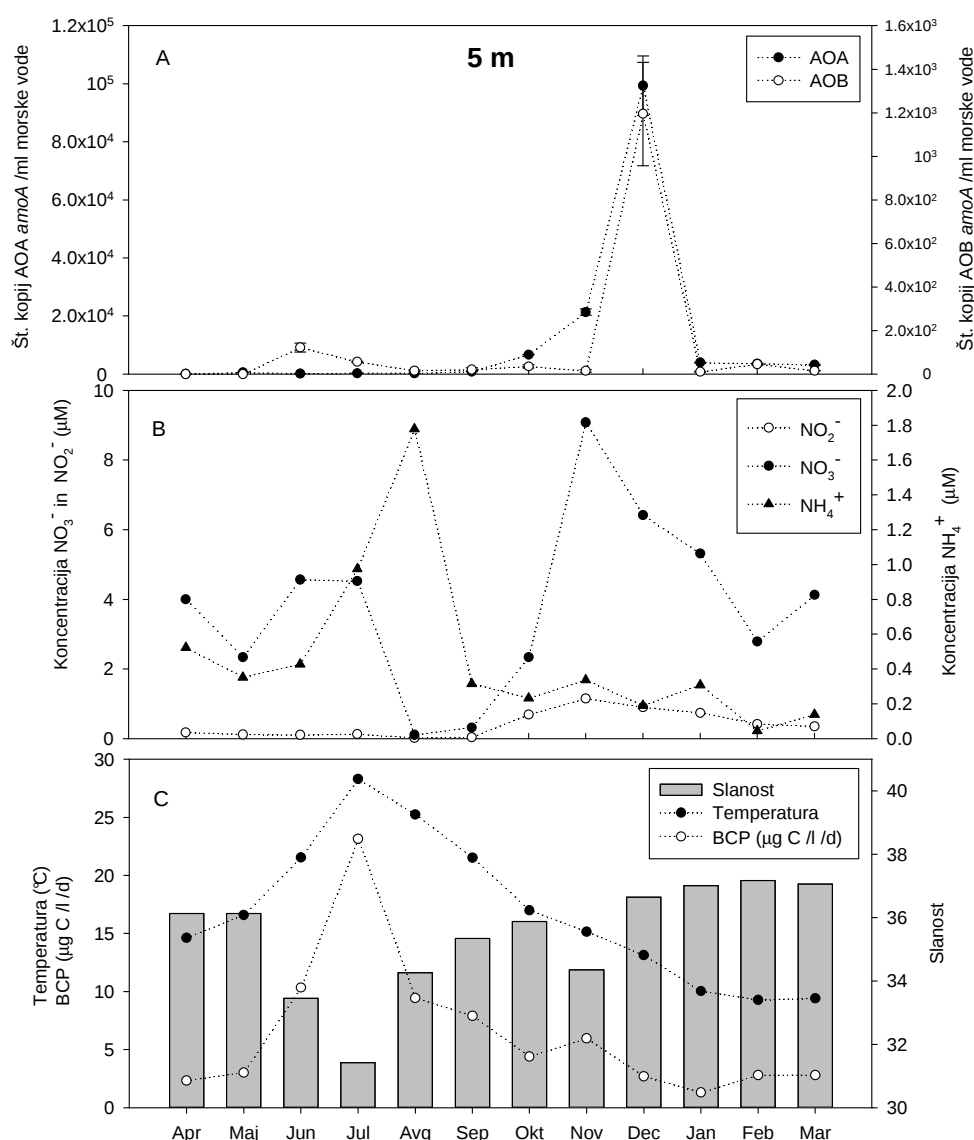
Tako kot NO_3^- in PO_4^{3-} , tudi bakterijska produkcija ogljika (BCP) v površinskem sloju sovпада z nizko slanostjo ter z visoko temperaturo (Slika 5.1-C). Najvišjo doseženo BCP smo izmerili julija (23,2 $\mu\text{g C/l/d}$). V pridnem sloju je povezanost dinamike BCP s slanostjo manj izrazita saj so nihanja slanosti v tem sloju manjša. Podobno kot v površinskem sloju je BCP pri dnu dosegla višek julija (12,1 $\mu\text{g C/l/d}$) manjši dvig pa smo zaznali septembra (6,21 $\mu\text{g C/l/d}$), ko je temperatura v pridnenem sloju najvišja (19,2 $^{\circ}\text{C}$) ter zopet februarja (5,93 $\mu\text{g C/l/d}$), ko je temperatura najnižja (8,8 $^{\circ}\text{C}$).

5.2.1.2 Letna dinamika bakterijskega in arhejskega gena *amoA*

Rezultati enoletnih analiz kvantifikacije gena *amoA* kažejo, da so na obeh opazovanih globinah AOA bolj razširjene kot βAOB za približno dva velikostna razreda (Slika 5.1-A, Slika 5.2-A). Tekom celega leta se je arhejski gen *amoA* pojavljal v večjih koncentracijah v pridnenem sloju v primerjavi s površinskim slojem, medtem ko so bile koncentracije betaproteobakterijskega gena *amoA* višje v površinskem sloju. V površinskem sloju (Slika 5.1-A) smo najvišjo koncentracijo arhejskega, kot tudi bakterijskega gena *amoA* zaznali

decembra (AOA *amoA*: $9,9 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ kopij/ml; β AOB *amoA*: $1195,2 \pm 237,4$ kopij/ml), medtem ko je bila njihova koncentracija na dnu vodnega stolpca (Slika 5.2-A) najvišja novembra (AOA: $1,3 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^4$ kopij *amoA*/ml; β AOB: $482,7 \pm 31,7$ kopij *amoA*/ml). Koncentracije AOA gena *amoA* so bile za 1-3 velikostne razrede višje v obdobju nizkih temperatur (oktober - marec), glede na koncentracije gena v obdobju visokih temperatur (april - september), na obeh globinah. Koncentracije bakterijskega gena *amoA* so bile višje (nad 100 kopij/ml) junija in decembra v zgornjem delu vodnega stolpca ter novembra in decembra v pridnenem sloju.

Korelacije med številčnostjo kopij AOA in β AOB gena *amoA* ter izbranimi okoljskimi dejavniki smo ocenili s pomočjo Spearsonovega korelacijskega koeficienta (Preglednica 5.1). Kljub temu, da je sezonska dinamika AOA in β AOB precej podobna na obeh preučevanih globinah (Slika 5.1; Slika 5.2), smo pozitivno statistično značilno korelacijo med obema amonij- oksidirajočima skupinama zaznali le v pridnenem sloju ($r_s = 0,76$; $p = 0,003$). AOA/ β AOB v pridnenem sloju korelirata s koncentracijo NO_2^- (AOA: $r_s = 0,94$; $p < 0,001$, β AOB: $r_s = 0,69$; $p = 0,013$). Statistično značilno pozitivno korelacijo zaznamo tudi med AOA ter koncentracijo NO_3^- ($r_s = 0,89$; $p < 0,001$) v pridnenem sloju, medtem ko je ta korelacija v primeru β AOB šibka in ni statistično značilna.

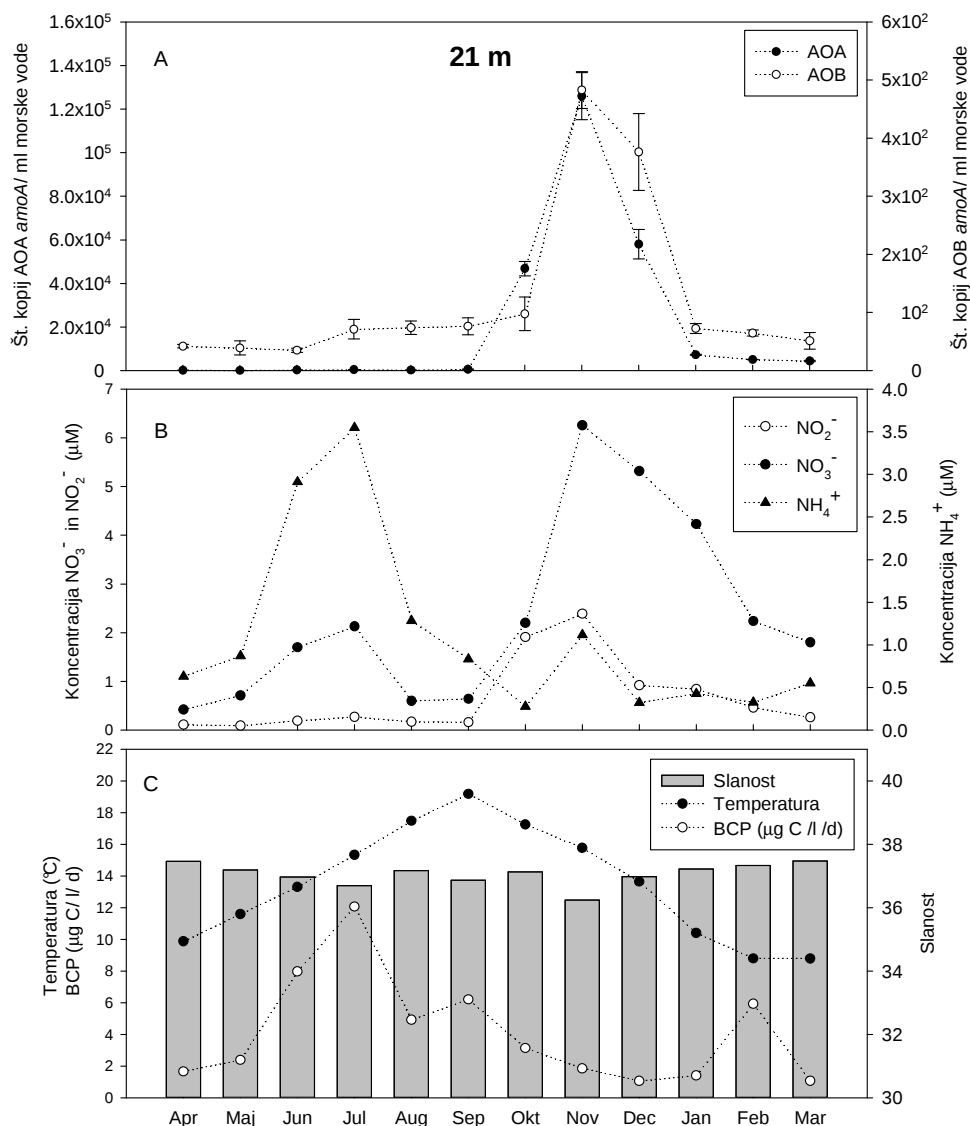


Slika 5.1: Sezonska dinamika AOA in βAOB, koncentracije anorganskih hranil (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺), slanosti, temperature in bakterijske produkcije (BCP) na globini 5 m v Tržaškem zalivu.

(A) Koncentracije arhejskega (AOA) in betaproteobakterijskega (βAOB) gena *amoA* so podane kot srednja vrednost števila kopij gena na ml morske vode ± SE za 3-4 reakcije. (B) Mesečne meritve koncentracij NO₂⁻, NO₃⁻ in NH₄⁺ izmerjene v podvzorcu nefiltrirane morske vode. (C) Mesečne meritve slanosti, temperature in bakterijske produkcije ogljika tekom leta (BCP).

Figure 5.1: Seasonal dynamic of AOA and βAOB, nutrient concentrations (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺), salinity, temperature and bacterial carbon production (BCP) at 5 m depth in the Gulf of Trieste.

(A) Concentrations of crenarchaeal (AOA) and betaproteobacterial *amoA* gene are given as an average value ± SE of 3-4 reactions. (B) Concentrations of NO₂⁻, NO₃⁻ in NH₄⁺ measured in unfiltered seawater. (C) Monthly values of temperature, salinity and bacterial carbon production (BCP).



Slika 5.2: Sezonska dinamika AOA in βAOB, koncentracije hranil (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺), slanosti, temperature in bakterijske produkcije (BCP) na globini 21 m v Tržaškem zalivu.

(A) Koncentracije arhejskega (AOA) in bakterijskega (βAOB) gena *amoA* so podane kot srednja vrednost števila kopij gena na ml morske vode ± SE za 3-4 reakcije. (B) Koncentracije NO₂⁻, NO₃⁻ in NH₄⁺ izmerjene v podvzorcu nefiltrirane morske vode. (C) Mesečne meritve slanosti in temperature in bakterijske produkcije ogljika tekom leta (BCP).

Figure 5.2: Seasonal dynamics of AOA and βAOB, nutrient concentrations (NO₂⁻, NO₃⁻, NH₄⁺), salinity, temperature and bacterial carbon production (BCP) at 21 m depth in the Gulf of Trieste.

(A) Concentrations of crenarchaeal (AOA) and betaproteobacterial *amoA* gene are given as an average value ± SE of 3-4 reactions. (B) Seasonal fluctuations of NO₂⁻, NO₃⁻ in NH₄⁺ measured in unfiltered seawater. (C) Variations in physical drivers (temperature and salinity) and dynamics of bacterial carbon production (BCP) across the year.

Preglednica 5.1: Povezave med številčnostjo AOA/BAOB in koncentracijami anorganskih hranil, meritvami fizikalnih parametrov in BCP v površinskem in pridnenem sloju Tržaškega zaliva.

Povezave med številčnostjo AOA/BAOB in okoljskimi dejavniki so podane kot Spearmanov koeficient korelacije pri čemer p vrednost podaja statistično značilnost korelacije pri 95 % intervalu zaupanja. Statistično značilne povezave ($p \leq 0,05$) so označene s poudarjenim tiskom.

Table 5.1: Correlations between AOA/BAOB, nutrient concentrations, measurements of physical parameters and BCP at the subsurface and near bottom layer in the Gulf of Trieste.

Correlation between factors is given as Spearman's rank correlation coefficient. p value indicates statistical significance of the correlation at the confidence level of 95 %. Statistically significant correlations ($p \leq 0,05$) are marked in bold.

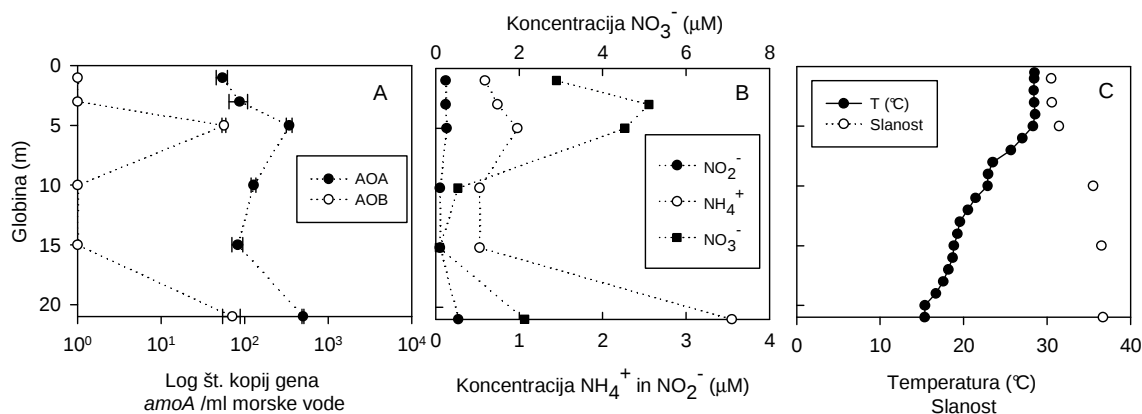
	5 m				21 m			
	AOA		BAOB		AOA		BAOB	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
PO_4^{3-}	0,26	0,402	-0,02	0,921	0,12	0,699	0,26	0,389
P_{tot}	0,29	0,352	0,19	0,542	0,05	0,869	0,37	0,224
NO_2^-	0,82	0,000	0,00	0,991	0,94	0,000	0,69	0,013
NO_3^-	0,42	0,165	0,17	0,588	0,89	0,000	0,55	0,062
NH_4^+	-0,72	0,007	-0,19	0,542	-0,53	0,071	-0,31	0,317
N_{tot}	0,38	0,215	0,37	0,224	0,76	0,003	0,48	0,105
temperatura	-0,48	0,105	0,24	0,442	0,12	0,699	0,62	0,029
pH	-0,50	0,094	0,11	0,716	-0,02	0,939	-0,32	0,295
raztopljani O_2	0,49	0,100	-0,10	0,733	-0,13	0,683	-0,22	0,484
slanost	0,42	0,165	-0,24	0,429	-0,28	0,364	-0,50	0,094
BCP	-0,35	0,253	0,43	0,157	-0,36	0,243	-0,22	0,484
BAOB	0,18	0,557			0,76	0,003		

V nasprotju z AOA, BAOB v pridnenem sloju sovpadajo s temperaturo, v površinskem sloju pa z nobenim od analiziranih dejavnikov. Na splošno so statistično značilne korelacije med oksidatorji amonija in ostalimi dejavniki pogostejše v pridnenem sloju. Koncentracije AOA v pridnenem sloju pozitivno korelirajo s koncentracijami totalnega dušika (N_{tot}) in negativno s koncentracijami amonijevega iona (NH_4^+). Tako AOA kot tudi BAOB ne korelirata s slanostjo, pH vrednostjo, koncentracijami raztopljenega kisika in bakterijsko produkcijo.

5.2.2 Razporeditev AOA in β AOB po vodnem stolpu v poletnem in zimskem obdobju

Porazdelitev AOA in β AOB po posameznih globinah vodnega stolpa Tržaškega zaliva (postaja 00BF) smo na podlagi koncentracij gena *amoA* analizirali v dveh temperaturno različnih obdobjih: (1) v poletnem obdobju (julij 2010), ko je v vodnem stolpcu prisotna močna temperaturna in gostotna razslojenost - stratifikacija (Slika 5.3) ter (2) v zimskem – obdobju nizkih temperatur (februar 2011) ko sta temperatura in slanost vzdolž vodnega stolpca homogeni (Slika 5.4).

V poletnem času, smo opazili nehomogeno razporeditev števila AOA in β AOB, ki sovпада predvsem s koncentracijo NO_3^- in deloma tudi z višjimi koncentracijami NH_4^+ (Slika 5.3). Tako kot v primeru letne razporeditve, številčnost AOA korelira z β AOB vzdolž vodnega stolpca v poletnem času ($r_s=0,98$; $p<0,001$), vendar so koncentracije za 1-2 velikostna razreda višje od β AOB. Število amonij- oksidatorjev je naraščalo od površja do globine 5 m, kjer smo zaznali tudi temperaturni in slanostni preskok. Pod to globino se je število AO zniževalo ter v pridnenem sloju (15- 21 m) zopet naraslo.



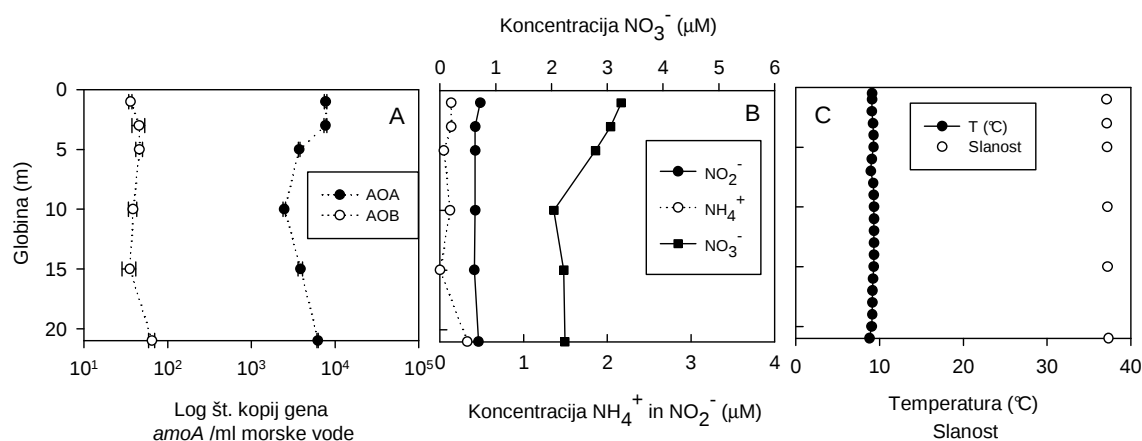
Slika 5.3: Vertikalna razporeditev AOA in β AOB, koncentracij dušikovih anorganskih spojin, temperature in slanosti vzdolž vodnega stolpca v poletnem času (julij 2010) v Tržaškem zalivu.

(A) grafikon prikazuje logaritemske vrednosti srednjih vrednosti števila kopij arhejskega in bakterijskega gena *amoA* $\pm$ SE iz 3-4 reakcij. (B) Koncentracije NO_2^- , NO_3^- in NH_4^+ izmerjene v podvzorcu nefiltrirane morske vode. (C) Globinski profil temperature (T) in slanosti.

Figure 5.3: Vertical distribution of β AOB and AOA, concentrations of inorganic nitrogen compounds, temperature and salinity through the water column during summer period (July 2010) in the Gulf of Trieste.

(A) The plot shows log values of the mean copy numbers of crenarhaeal and bacterial *amoA* gene $\pm$ SE obtained from 3-4 reactions. (B) Concentrations of NO_2^- , NO_3^- in NH_4^+ measured in unfiltered subsample of seawater. (C) Temperature (T) and salinity depth profile.

V zimskem obdobju je bila razporeditev AOA, β AOB kot tudi koncentracije dušikovih anorganskih hranil veliko bolj enakomerna (Slika 5.4). Kljub homogeni razporeditvi po vodnem stolpu smo izmerili rahlo povišane koncentracije AOA v površinskem sloju (1 - 5 m) in v pridenenem sloju kar sovпада s povišanimi koncentracijami NO_3^- .



Slika 5.4: Vertikalna razporeditev AOA in β AOB, koncentracij dušikovih anorganskih spojin, temperature in slanosti vzdolž vodnega stolpca v zimskem času (februar 2011) v Tržaškem zalivu.

(A) grafikon prikazuje logaritemske vrednosti srednjih vrednosti števila kopij arhejskega in bakterijskega gena *amoA* $\pm$ SE iz 3-4 reakcij. (B) Koncentracije NO_2^- , NO_3^- in NH_4^+ izmerjene v pod vzorcu nefiltrirane morske vode. (C) Globinski profil temperature in slanosti.

Figure 5.4: Vertical distribution of β AOB and AOA, concentrations of inorganic nitrogen compounds, temperature and salinity through the water column in winter period (February 2011) in the Gulf of Trieste.

(A) The plot shows log values of the mean copy numbers of crenarhaeal and bacterial *amoA* gene $\pm$ SE obtained from 3-4 reactions. (B) Concentrations of NO_2^- , NO_3^- in NH_4^+ measured in unfiltered subsample of seawater. (C) Temperature (T) and salinity depth profile.

5.2.3 Razmerje med številom arhejskih genov *amoA* in MGI 16S rRNA geni

Da bi preverili ali vse arheje iz skupine *Thaumarchaeota* MGI posedujejo gen *amoA* in so potencialno zmožne oksidacije amonija, smo preverili kakšno je razmerje med številom arhejskih genov *amoA* in 16S rRNA geni skupine MGI (Preglednica 5.2).

Preglednica 5.2: Razmerja med številom arhejskih genov *amoA* in 16S rRNA geni skupine MGI v vodnem stolpu Tržaškega zaliva tekom leta.

Table 5.2: Archaeal *amoA*:16S rRNA gene ratios observed in the Gulf of Trieste water column through the year.

AOA <i>amoA</i> : MGI 16S rRNA		
	5 m	21 m
april	MGI pod LOQ	0,4
maj	MGI pod LOQ	0,3
junij	MGI pod LOQ	0,5
julij	2,4	0,2
avgust	14,1	0,2
september	10,7	0,6
oktober	1,3	1,4
november	1,4	1,4
december	1,7	1,5
januar	1,7	1,5
februar	1,8	1,4
marec	1,5	1,4

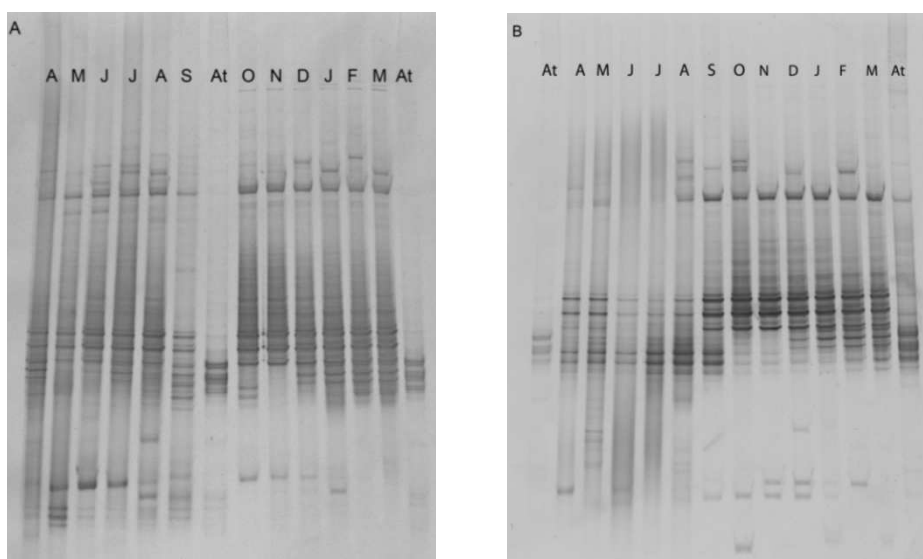
Razmerje med genoma je bilo v toplejšem delu leta v površinskem sloju zelo visoko (2,4 – 14,1), kar nakazuje na prisotnost genov *amoA* v odsotnosti oziroma ob zelo nizkem številu MGI 16S rRNA genov. Medtem ko je bilo v pridnenem sloju razmerje < 1 (0,2 -0,6), ker bi pomenilo prisotnost arhej skupine MGI brez prisotnosti genov *amoA*. V hladnejših mesecih je bilo razmerje v obeh slojih zelo podobno ter v prid gena *amoA* in sicer od 1,3 do 1,8.

5.2.4 Analiza diverzitete znotraj združbe AOA

Na podlagi variabilnosti gena *amoA* smo preverjali spremembe v sestavi združbe AOA tekom leta in razlike med združbami površinskega in pridnenega sloja.

5.2.4.1 Struktura združbe AOA določena z metodo denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE)

DGGE analiza fragmenta arhejskega gena *amoA* je pokazala, da se struktura združbe arhejskih amonij- oksidatorjev tekom leta spreminja (Slika 5.5). Ločena DGGE analiza je bila narejena iz vzorcev površinskega sloja (5 m) ter iz vzorcev pridnenega sloja (21 m). Razlike med površinsko in pridneno združbo AOA smo opazili predvsem v številčnosti posameznih filotipov - DGGE fragmentov ter predvsem v toplejših mesecih.



Slika 5.5: Fotografija gelov DGGE analize fragmentov arhejskega gena *amoA* iz morske vode vzorčene v Tržaškem zalivu na globini 5 m (A) in 21 m (B) od aprila 2010 do marca 2011 (označeni s prvo črko meseca)

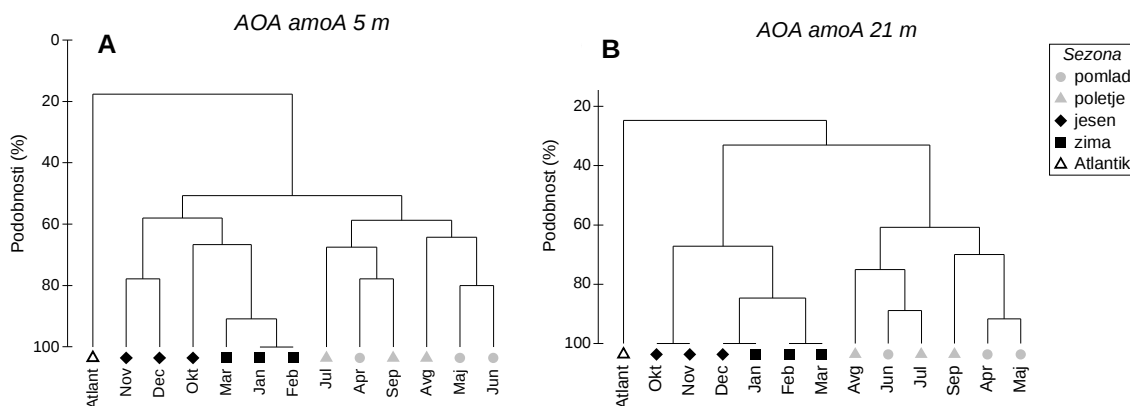
At – pozitivna kontrola združbe AOA iz ekvatorialnega dela Atlantskega oceana (100 m).

Figure 5.5: Photo of DGGE gels of archaeal *amoA* gene fragments of seawater samples collected at 5 m (A) and 21m depth (B) from April 2010 to March 2011(indicated by a capital letter of the month) in the Gulf of Trieste.

At – positive control –AOA community from the equatorial region of Atlantic Ocean (100 m).

Analiza razvrščanja elektroforetskih vzorcev DGGE vseh analiziranih vzorcev v skupine, je združbo AOA na obeh preučevanih globinah razdelila v dve jasno ločeni skupini (Slika 5.6). Prvo skupino sestavljajo združbe vzorčene v hladnejših mesecih (oktober – marec),

medtem ko druga skupina sestoji iz združb vzorčenih v toplejših mesecih (april – september). Kot referenco za povezavo med posameznimi analizami smo uporabili vzorec združbe AOA odvzet v ekvatorialnem delu Atlantskega oceana iz globine 100 m. Podobnost med združbo AOA iz Atlantika in združbami iz severnega Jadrana znaša manj kot 25 %.



Slika 5.6: Dendrogram analize razvrščanja v skupine DGGE fragmentov arhejskega gena *amoA* iz posameznih mesečnih vzorcev morske vode od aprila 2010 do marca 2011 na globini 5 m (A) in 21 m (B) v Tržaškem zalivu.

Slika prikazuje dendrogram, ki smo ga pridobili po metodi neponderirane aritmetične sredine (UPGMA) na podlagi DGGE analize. Atl_100m označuje pozitivno kontrolo – AOA združbo iz ekvatorialnega dela Atlantskega oceana (100 m).

Figure 5.6: Dendrogram obtained with cluster analysis of DGGE banding patterns of crenarchaeal *amoA* gene fragments in seawater samples collected monthly from April 2010 till March 2011 at 5m (A) and 21 m depth (B) in the Gulf of Trieste.

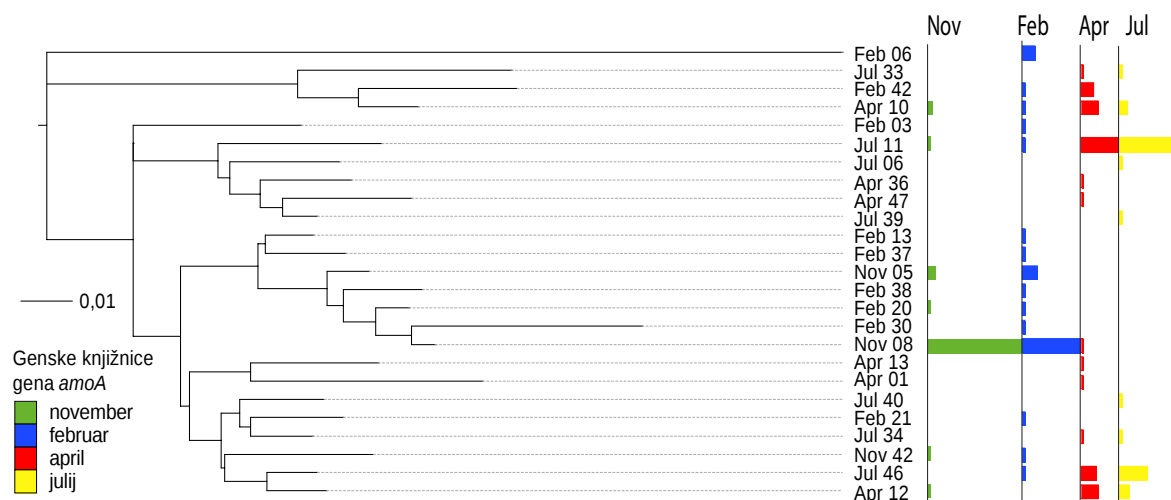
Figure shows similarity dendrogram, constructed using UPGMA clustering method based on DGGE banding patterns. Atl_100 m denotes the positive control – AOA community from the equatorial region of Atlantic Ocean (100 m).

5.2.4.2 Filogenska analiza združbe AOA

Da bi dobili vpogled v sestavo združbe AOA smo pripravili genske knjižnice arhejskega gena *amoA*. Ker so rezultati analize DGGE pokazali, da se združba AOA v vzorcih površinskega in pridnenega sloja bistveno ne razlikuje, smo se odločili za nadaljnjo analizo združbe AOA le na globini 21 m, kjer je bila koncentracija tekom leta višja, kar omogoča

večjo zanesljivost končnega rezultata (višje koncentracije izolirane DNA). Za izdelavo genskih knjižnic smo izbrali samo en vzorec iz vsake sezone.

Analiza filogenetskega drevesa izdelanega na osnovi pridobljenih sekvenc gena *amoA* potrjuje sezonsko raznolikost združb, ki smo jo zaznali že s predhodnimi analizami DGGE. Drevo sestoji iz klastrov, ki večinoma zajemajo sekvence iz vzorcev pobranih v mesecih z nižjimi (november in februar) ali višjimi temperaturami (april in junij) (Slika 5.7).



Slika 5.7: Filogenetsko drevo arhejskega gena *amoA* – sestava združbe AOA v vzorcih morske vode pobranih v štirih različnih mesecih (november, februar, april in julij) v pridenem sloju (21 m) v Tržaškem zalivu.

Filogenetsko drevo arhejskega gena *amoA* je bilo narejeno na osnovi analize združevanja najbližjega soseda (Neighbour - Joining). Sekvence gena *amoA* so bile predhodno grupirane v operative taksonomske enote (Operational Taxonomic Unit - OTU) na podlagi 98 % podobnosti na nukleotidni ravni. V drevesu so zajeti predstavniki vsake OTU skupine sekvenc. Stolpni diagram (desna stran drevesa) podaja število sekvenc iz posamezne sezone v posamezni OTU skupini, pri čemer najdaljši stolpec (Nov 8 –M13-FP; Nov) zajema 38 sekvenc gena *amoA*. Merilo predstavlja filogenetsko razdaljo.

Figure 5.7: Phylogeny of archaeal *amoA* gene – AOA community structure in seawater samples collected in four different months (November, February, April and July) at the near bottom layer (21m) in the Gulf of Trieste.

Phylogenetic tree was constructed using Neighbour-Joining analysis of crenarchaeal *amoA* gene sequences. Sequences were initially distributed in taxonomic unites OTUs based on 98 % similarity. A representative sequence of each OTU was used in tree construction. Bar chart at the right side of the tree shows the

abundance of sequences in each OTU, the longest bar (Nov 8 –M13-FP; Nov) represent 38 sequences. The tree scale represents phylogenetic distance.

Pestrost združbe AOA smo ocenili na podlagi števila avtonomnih taksonomskih enot (OTU). V primeru analize DGGE smo vsak fragment tretirali kot posamezno OTU. Medtem ko smo v genskih knjižnicah gena *amoA* OTU določili kot enoto, ki povezuje posamezne sekvence, katerih podobnost na nukleotidnem nivoju je večja od 98 %. Pestrost je bila višja v hladnejšem delu leta ter v pridnenem sloju. Rezultati analize DGGE in sekvenciranja so pokazali zelo podobno pestrost (Preglednica 5.3).

Preglednica 5.3: Pestrost združbe AOA v Tržaškem zalivu tekom leta.

Pestrost je podana kot število OTU v posameznem vzorcu. Z odebeljenim tiskom so označene pestrosti v času, ko je bila združba AOA najštevilčnejša.

Table 5.3: Diversity of AOA community in the Gulf of Trieste across the year.

The diversity is given as a number of OTUs per sample. Number of OTUs in samples with the largest AOA community is marked in bold.

	OTU DGGE		OTU Genske knjižnice
	5 m	21 m	21 m
april	7	11	12
maj	4	12	
junij	5	8	
julij	7	9	9
avgust	7	9	
september	9	14	
oktober	11	8	
november	7	8	7
december	9	11	
januar	11	11	
februar	11	13	15
marec	10	13	

5.3 PESTROST ARHEJSKE IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V MORSKEM SNEGU IN VEČJIH ORGANSKIH AGREGATIH

Prisotnost in pestrost bakterijske in arhejske združbe smo analizirali v vzorcih morskega snega oziroma v večjih organskih agregatih, ki smo jih vzorčili tekom leta na standardni vzorčevalni postaji v Tržaškem zalivu (00BF) s pomočjo potapljačev. Natančni podatki vzorčenja s podatki izmerjenih temperatur, slanosti, ortofosfata in dušikovih hranilnih spojin so podani v preglednici (Preglednica 5.4). Agregati morskega snega, vzorčeni decembra 2009, aprila, julija in 12. avgusta 2010 so bili veliki od 1 mm do 1 cm, medtem ko so bili morski agregati vzorčeni junija 2010 nitasti, dolgi od 5 do 10 cm. Največji agregati nitaste oblike so bili vzorčeni konec poletja – 26. avgusta 2010, dolgi tudi do 20 cm. Manjše organske delce (do 1 cm) smo poimenovali »morski sneg«, večje organske aggregate vzorčene julija in avgusta pa »organski agregati« ali krajše »agregati«. Delci morskega snega in agregati, so se kljub močni gostotni razslojenosti vodnega stolpca v poletnih mesecih in premešanem vodnem stolpcu v hladnejših mesecih vedno nahajali v območju enake slanosti: 36-37 PSU.

V vzorcih različno velikih agregatov in okolni vodi smo določili sestavo bakterijske in arhejske združbe z različnimi metodami: z metodo CARD-FISH na podlagi epifluorescentne mikroskopije, metodo T-RFLP in analizo genskih knjižnic bakterijske in arhejske 16S rRNA. Agregati, ki so bili vzorčeni s siringo so nam služili za karakterizacijo mikrobne združbe povezane z organskimi delci, medtem ko nam je okolna morska voda služila za karakterizacijo prostoživečih mikrobnih združb.

Preglednica 5.4: Fizikalno - kemijski parametri izmerjeni v vzorcih morske vode Tržaškega zaliva v obdobju vzorčenja morskega snega in agregatov.

Oznaka nd pomeni, da parameter v vzorcu ni bil izmerjen, * slanost je bila izmerjena na globini 2 m, ** temperatura izmerjena na globini 2 m in 22 m.

Table 5.4: Physico-chemical parameters measured in unfiltered seawater in the Gulf of Trieste during the periods of marine snow and aggregates sampling.

Mark nd signifies that the parameter was not determined, * measured at 2 m depth, **temperature measured at 2 m and 22 m depth.

Datum vzorčenja	Globina (m)	Temperatura ¹ (°C)	Slanost ² (PSU)	Globina ³ (m)	PO ₄ ³⁻ (μM)	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ (μM)	NH ₄ ⁺ (μM)	Razmerje N:P
10.12.2009	10 m	13,5 - 14,6**	36,8*	/	nd	nd	nd	/
23.04.2010	10 m	14,3	36,4	10	0,06	3,9	0,3	70,8
				10	0,05	2,8	0,3	61,2
07.06.2010	12 -13 m	17,5	35,9	15	0,05	1,6	1,4	60,3
				10	0,09	0,6	0,5	12,3
15.07.2010	12 m	20,4	36,0	15	0,11	0,1	0,5	6,0
				10	0,06	0,1	0,3	6,4
12.08.2010	13 m	20,9	36,6	15	0,06	0,3	0,4	11,2
				10	0,05	0,2	0,1	6,5
26.08.2010	13 m	21,2	36,0	15	0,08	0,3	0,5	9,6

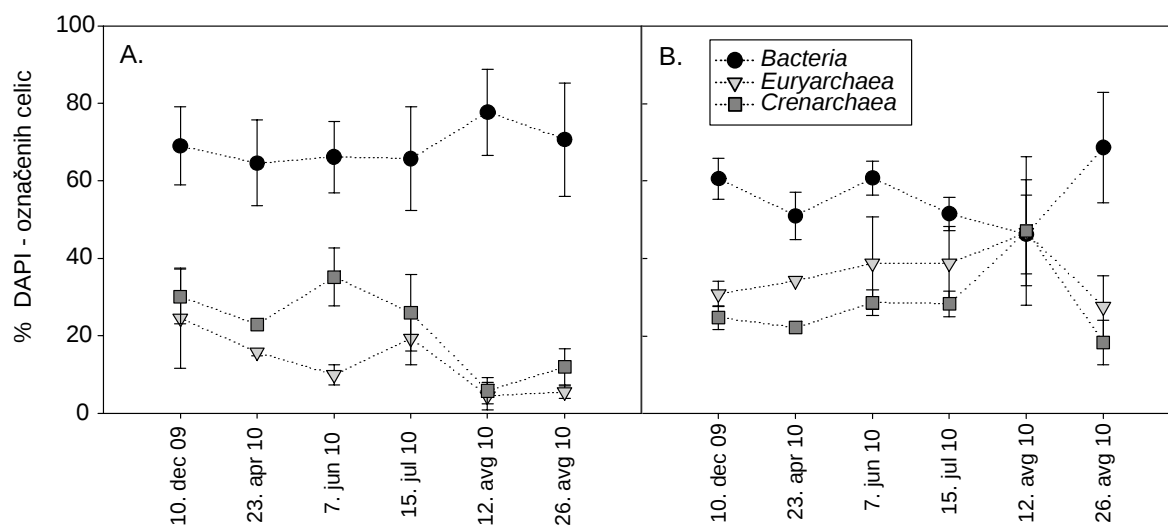
¹ Temperatura na globini odvzema vzorcev

² Slanost na globini odvzema vzorcev

³ Globina odvzema vzorcev za analizo vsebnosti hranil

5.3.1 Mikroskopske analize prokariotske združbe v morskem snegu in agregatih ter okolni vodi

Sestavo celotne prokariotske združbe smo najprej določili z metodo CARD-FISH in štetjem fluorescentno označenih celic pod epifluorescentnim mikroskopom. Ocenili smo relativni delež krenarhejskih (zajete tudi *Thaumarchaeota*), *Euryarchaeota* in bakterijskih celic glede na celokupno število celic obarvanih s fluorokromom DAPI, ki nespecifično označuje vse celice. Spremembe relativnega deleža krenarhejskih, *Euryarchaeota* ter bakterijskih celic glede na totalno število celic v vzorcih morskega snega in okolne vode prikazuje Slika 5.8



Slika 5.8 Relativni delež arhejskih, *Euryarchaeota* ter bakterijskih celic glede na totalno število DAPI obarvanih celic v vzorcih morske vode (A) in morskega snega (B) pridobljen z analizo CARD-FISH.

Figure 5.8: Relative contribution of *Crenarchaea*, *Euryarchaea* and *Bacteria* according to total number of DAPI stained cells detected by CARD-FISH in seawater (A) and particle enriched samples (B).

Bakterijske celice v morskem snegu in agregatih predstavljajo od 40 do 65 % celotne prokariotske združbe, še višji pa je njihov delež v morski vodi (60 – 80 %). Rezultati mikroskopskih analiz potrjujejo prisotnost krenarhejskih in *Euryarchaeota* celic v agregatih, čeprav pomnoževanje njihovih genov z metodo PCR ni bilo uspešno, predvsem v vzorcih poletnih mesecev. Relativni delež celic *Crenarchaeota* in *Euryarchaeota* je bil v vseh pregledanih vzorcih višji v agregatih v primerjavi z okolno vodo. Zanimivo je, da je delež evriarhejskih celic v vzorcih agregatov (med 20 – 50 %) višji od deleža arhej in višji od deleža le teh v morski vodi, kjer večinoma ne presega 20 % populacije. V primeru arhejskih celic obeh skupin v vzorcih morske vode lahko vidimo trend zniževanja relativnega deleža od zime proti poletju, medtem ko je trend v vzorcih morskega snega ravno obraten (Slika 5.8).

5.3.2 Pestrost prokariotske združbe v morskem snegu in agregatih ter okolni vodi

Pestrost bakterijske združbe v morskem snegu in agregatih ter okolni vodi smo v vseh vzorcih ocenili z metodo T-RFLP na podlagi gena 16S rRNA. Analize T-RFLP pa ni bilo

mogoče izvesti v primeru arhejske združbe. Pomnoževanje arhejskih 16S rRNA genov v agregatih s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, ki se uporabljajo za analize T-RFLP, je bilo v večini primerov neuspešno. Ravno tako ni bilo uspešno pomnoževanje gena *amoA*, na podlagi katerega smo želeli preveriti prisotnost in raznolikost združbe β AOB in AOA v večjih agregatih.

Da bi bolje raziskali kakšne so prokariontske združbe v morskem snegu in agregatih ter obdajajoči vodi v dveh zelo različnih letnih časih smo izdelali knjižnice arhejskih in bakterijskih 16S rRNA genov. Genske knjižnice smo izdelali iz vzorcev vzorčenih pozimi (10. december 2009), ko je bil vodni stolpec dobro premešan in je bila vertikalna razporeditev temperature homogena ter iz poletnih vzorcev (26. avgust 2010), ko je bila stratifikacija vodnega stolpca zelo izrazita in se pojavljajo večji agregati v obliki sluznih nitk in manjših oblakov.

Poleg genskih knjižnic gena 16S rRNA smo naredili tudi knjižnice 16S rRNA transkriptov v vzorcih morske vode (v vzorcih organskih partiklov količina rRNA ni bila zadostna za tovrstno analizo). S tem smo želeli analizirati metabolno aktivni del bakterijske združbe. Pri pomnoževanju arhejske 16S rRNA iz cDNA (za analizo aktivne arhejske združbe) nismo bili uspešni.

5.3.2.1 Pestrost bakterijske združbe v morskem snegu, agregatih in okolni vodi

5.3.2.1.1 Ocena raznolikosti bakterijske združbe z metodo T-RFLP

S smernim začetnim nukleotidom smo skupno v vseh vzorcih zaznali 144 s FAM označenih restrikcijskih fragmentov različnih dolžin, ki glede na ločljivost metode predstavljajo različne bakterijske operacijske taksonomske enot (OTU). S protismernim začetnim nukleotidom pa smo skupno zaznali 83 z VIC označenih fragmentov različnih dolžin - bakterijskih OTU enot. Od tega je bilo 1,4 – 3 % OTU enot prisotnih v vseh vzorcih in 25 – 27 % takih, ki so bile prisotne samo v enem vzorcu. Pestrost bakterijske združbe je bila glede na število zaznanih OTU višja v vzorcih morske vode (34 - 63 OTU) kot v vzorcih z agregati (15 - 40 OTU), razen v primeru velikih agregatov nabranih 26. avgusta 2010. Pestrost aktivne bakterijske združbe je bila od 1,3 do 1,6 x nižja od pestrosti

združbe prisotne v morski vodi, vendar se je pestrost aktivne združbe spreminjala premosorazmerno glede na pestrost prisotne združbe. (Preglednica 5.5).

Preglednica 5.5: Število bakterijskih OTU enot pridobljenih s T-RFLP analizo bakterijskih 16S rRNA (16S rDNA) genov in 16S rRNA (16S rRNA) iz vzorcev morskega snega in agregatov v Tržaškem zalivu.

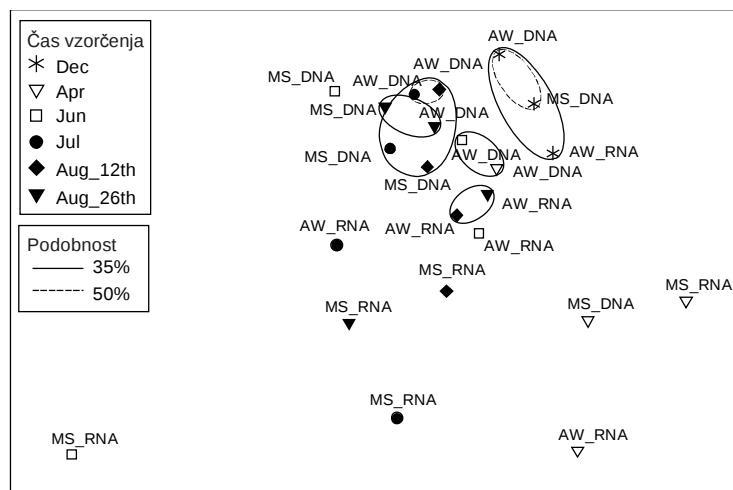
Število OTU enot je podano ločeno za s FAM označene fragmente (smerni začetni oligonukleotid) ter za VIC označene fragmente (protismerni začetni oligonukleotid). MS: morski sneg in agregati, AW: okolna voda, n.d.: ni bilo narejeno.

Table 5.5: Number of OTUs detected by T-RFLP analysis of bacterial 16S rRNA and 16S rRNA genes (16S rDNA).

Numbers of OTU are given separately for FAM-labelled forward fragments (OTUs FAM) and VIC- labelled reverse fragments (OTUs VIC). MS: marine snow sample, AW: ambient water sample, n.d.: not done.

Datum vzorčenja	Tip vzorca	16S rDNA		16S rRNA	
		število OTU- FAM	število OTU- VIC	število OTU- FAM	število OTU- VIC
10. 12. 2009	AW	53	31	32	17
	MS	37	22	n.d.	n.d.
23. 4. 2010	AW	34	18	7	4
	MS	15	7	25	18
7. 6. 2010	AW	42	28	20	15
	MS	29	25	5	4
15. 7. 2010	AW	46	28	22	15
	MS	38	29	24	11
12. 8. 2010	AW	63	40	29	16
	MS	30	20	24	10
26. 8. 2010	AW	40	26	22	17
	MS	40	35	16	11

Podobnost bakterijskih združb med vzorci smo ocenili z analizo nMDS T-RFLP rezultatov (Slika 5.9). Analiza je združila bakterijske združbe, ki so bile vzorčene znotraj iste sezone v 4 skupine s 30 % podobnostjo. Prva skupina zajema vzorce nabrane decembra, drugi dve zajemajo poletne vzorce, četrta skupina pa združuje aprilsko in junijsko bakterijsko združbo iz morske vode, medtem ko so, združbi iz morskega snega iz teh dveh mesecev povsem ločeni.



Slika 5.9: nMDS prikaz podobnosti bakterijskih združb v vzorcih morskega snega in vode iz Tržaškega zaliva določenih na podlagi rezultatov T-RFLP analize bakterijskih 16S rRNA genov in 16S rRNA.

Različni simboli predstavljajo bakterijske združbe iz različnih vzorčenj, pri čemer oznaka MS označuje z agregati obogatene vzorce, oznaka AW pa vzorce okolne vode, DNA – 16S rDNA: prisotna združba, RNA – 16S rRNA: aktivna združba.

Figure 5.9: nMDS ordination of similarity of bacterial communities assessed by T-RFLP fingerprinting in seawater samples and marine aggregates in the Gulf of Trieste.

Symbols represent different sampling dates. MS – particle enriched sample, AW – ambient water sample, DNA – 16S rDNA (present community), RNA – 16S rRNA (active community).

Rezultati nMDS analize kažejo, da se metabolno aktivne bakterije, še posebej tiste iz morskga snega in agregatov, ločijo od celotne bakterijske združbe (16S rDNA). Razlika je statistično značilna (ANOSIM $R = 0,21$; $p = 0,02$) in se kaže v razporeditvi aktivnih združb na grafikonu nMDS v spodnji del grafikona medtem, ko so prisotne bakterijske združbe večinoma na zgornjem delu grafikona, izjema so le prostoživeče aktivne bakterijske združbe vzorčene decembra, avgusta in junija, ki so na grafikonu nekoliko bližje bakterijskim združbam iz istih vzorcev (Slika 5.9). Statistična analiza je tudi pokazala, da je vpliv samega življenjskega prostora (agregati /okolna voda) na sestavo bakterijske združbe neznačilen (ANOSIM $R = 0,055$; $p = 0,1$), medtem ko okoljske spremembe vezane na letni čas, značilno vplivajo na oblikovanje tako prostoživeče kot tudi na partikulatno organsko snov vezane bakterijske združbe (ANOSIM $R = 0,21$, $p = 0,02$).

5.3.2.1.2 Podrobnejša filogenetska analiza bakterijske združbe iz morskih agregatov in okolne vode

Genske knjižnice bakterijskega gena 16S rRNA smo izdelali iz vzorcev morske vode in agregatov vzorčenih v mesecu decembru 2009, ko je bil vodni stolpec dobro premešan ter v mesecu avgustu 2010, v obdobju razslojenega vodnega stolpa in velikih temperaturnih razlik.

Preglednica 5.6: Pregled kazalcev diverzitete s porazdelitvijo vrst bakterijskih genskih knjižnic 16S rDNA in 16S rRNA v vzorcih morskega snega in okolne vode v Tržaškem zalivu.

Podane so tudi velikosti genskih knjižnic (N) in število OTU enot ki združujejo sekvence na podlagi 97 % podobnosti. Dec: Vzorci nabrani decembra 2009, Avg: vzorci nabrani avgusta 2010, MS: morski sneg in agregati, AW: okolna voda, rDNA: geni 16S rRNA, rRNA: 16S rRNA n.a.: izračun ni mogoč.

Table 5.6: Diversity indices calculated based on bacterial 16S rRNA and 16S rDNA clone libraries obtained from sampels of marine snow and sorounding seawater from the Gulf on Triest.

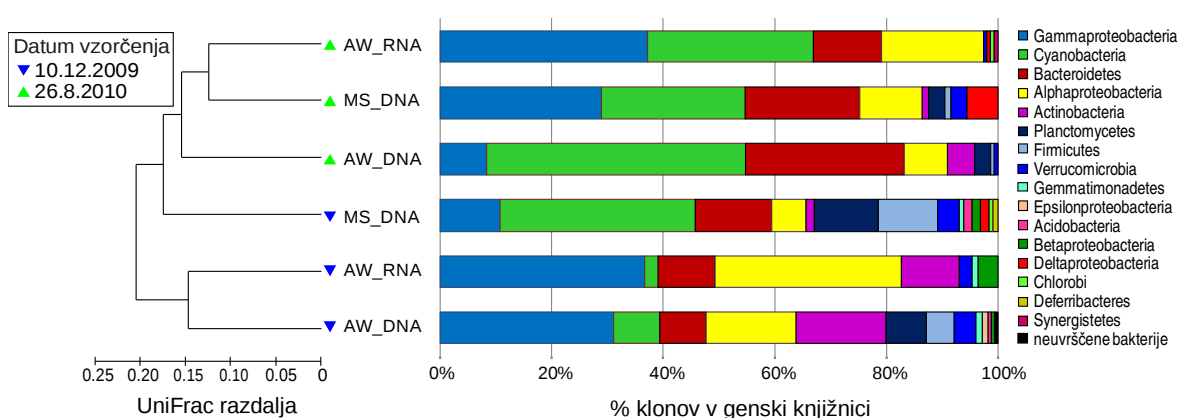
Table shows the number of obtained sequences per each clone library (N) and number of OTUs based on 97 % sequence similarity. Dec: December 2009, Avg: August 2010, MS: marine snow sample, AW: ambient water sample, rDNA: 16S rRNA genes, rRNA: 16S rRNA. n.a.- not applicable

Vzorec	Število sekvenc (N)	Število OTU enot (S)	Ocenjena diverziteta (Chao1)	Margalefov kazalec pestrosti (D)	Shannonov kazalec vrstne diverzitete (H'(log e))	Pieloujev kazalec enakomernosti porazdelitve vrst (J')
16S rDNA Dec AW	180	91	253	17,3	4	0,88
16S rDNA Dec MS	130	69	331	14	3,7	0,87
16S rRNA Dec AW	87	46	84	10	3,5	0,93
16S rDNA Avg AW	168	51	68	9,8	2,9	0,74
16S rDNA Avg MS	178	77	99	15	3,7	0,85
16S rRNA Avg AW	158	51	143	9,9	2,8	0,7

Decembra smo največjo diverziteto in pestrost bakterijske združbe zaznali v vzorcu morske vode (Margalef D = 17,3; Shannon H' = 4 ;Preglednica 5.6), medtem ko je bila avgusta pestrost in diverziteta večja v vzorcu agregatov (D=15; H'= 3,7). Najnižjo pestrost smo zaznali v morski vodi avgusta tako v primeru prisotne kot tudi v primeru aktivne

bakterijske združbe. Kljub visoki diverziteti združbe v decembrski vodi, je bilo manj predstavnikov združbe aktivnih ($D=10$).

UniFrac analiza podobnosti med združbami je le te razporedila v dve ločeni skupini, v prvi skupini so avgustovske bakterijske združbe in združba bakterij iz morskega snega vzorčena decembra, medtem ko sta v drugi skupini aktivna in prisotna bakterijska združba iz decembrskega vzorca morske vode. Med seboj sta si najbolj podobni združba, ki naseljuje avgustovske agregate ter aktivna združba bakterij v okolni vodi (Slika 5.10).



Slika 5.10: Sestava bakterijske združbe v vzorcih agregatov in okolne morske vode v Tržaškem zalivu vzorčenih 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010 .

Prikazan je dendrogram narejen po metodi UPMGA na podlagi UniFrac distančne matrike okolij (Lozupone et al. 2006). Horizontalni stolpci ob dendrogramu ponazarjajo relativno razširjenost posameznih bakterijskih skupin v posameznem vzorcu. PAR označuje vzorce agregatov in SW vzorce morske vode. DNA: 16S rRNA gen predstavlja prisotno bakterijsko združbo, RNA: 16S rRNA – predstavlja aktivno bakterijsko združbo. Razdalja vej na dendrogramu je podana v UniFrac distančnih enotah, kjer 0 pomeni, da je sestava dveh združb povsem enaka, 1 pa da je si združbi ne delijo nobene bakterijske skupine.

Figure 5.10: Bacterial community composition in aggregates and surrounding seawater in the Gulf of Trieste collected 10th December 2009 and 26th August 2010.

UPGMA dendrogram constructed based on UniFrac environment distance matrix (Lozupone in sod., 2006), followed by proportion of clones affiliated to each phylogenetic group as compared to the total number of clones obtained for each individual sample. Distances between samples are given in UniFrac units (0 = two environments are identical, 1= two environments contain exclusive lineages). SW: seawater sample, PAR: particle enriched sample DNA: 16S rDNA, RNA: 16S rRNA.

Filogenetska analiza genskih knjižnic je pokazala, da so v vseh vzorcih najbolj razširjene bakterije iz razredov *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria* (predstavljajo več kot 20 % bakterijske populacije v vsaj enem od analiziranih vzorcev) (Slika 5.10). Cianobakterije prevladujejo predvsem v avgustovskih vzorcih, kjer predstavljajo zelo velik delež bakterijske populacije. Večino cianobakterijskih sekvenc v genskih knjižnicah analiziranih vzorcev pripada skupini *Synechococcus*. V vzorcu morske vode vzorčene avgusta, *Synechococcus* predstavlja skoraj polovico celotne bakterijske populacije (43 %) in skoraj tretjino aktivne bakterijske populacije (30 %). Nekoliko manjši je delež v vzorcih avgustovskih morskih agregatov (22 %) (Slika 5.11). Nasprotno je bil delež cianobakterij *Synechococcus* decembra višji v agregatih (18 %) v primerjavi z okolno vodo (3 %) kjer je manjši tudi delež v aktivni populaciji (2,3 %). Poleg vrste *Synechococcus* se le redko pojavljajo tudi cianobakterije iz skupine *Prochlorococcus* (2 % celotne populacije v morski vodi avgusta). Med cianobakterijske sekvence se uvrščajo tudi kloroplastne 16S rRNA sekvence evkariotskih fitoplanktonskih vrst, ki smo jih zaznali največ v morskem snegu decembra (17 %).

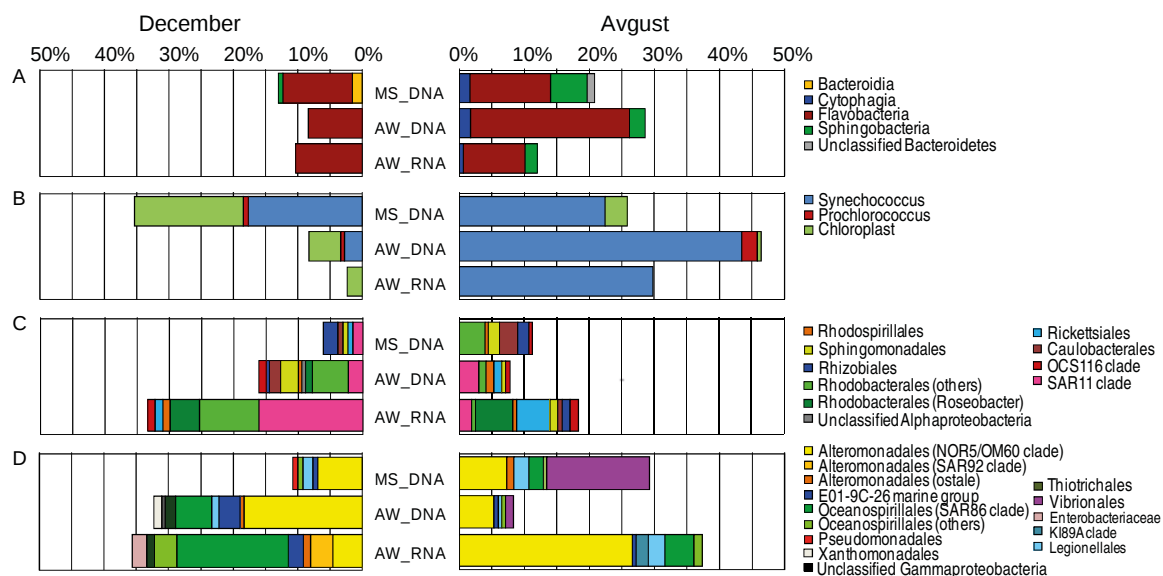
Bakteroidete so bile prav tako manj številčne v decembrskih vzorcih vode in morskega snega (8,3 % in 13,8 % populacije) ter bolj številčne v poletnem času (28,6 % populacije v vodi in 20 % populacije v agregatih). Znotraj skupine bakteroidet so bile bakterije iz razreda *Flavobacteriia* najbolj zastopane ter najbolj aktivne v vseh analiziranih vzorcih. Poleg slednjih smo zaznali tudi nekaj bakterij iz razreda *Bacteroida* (1,5 %) in *Sphingobacteria* (0,8 %) v vzorcu decembrskega morskega snega ter nekaj bakterij iz razreda *Cytophagia* in *Sphingobacteria* v poletnih vzorcih morske vode in agregatov (Slika 5.11).

Razširjenost gamaproteobakterijskih celic v vzorcih morske vode in vzorcih morskega snega je bila v dveh različnih sezonah ravno nasprotna. Medtem ko so le te predstavljale velik delež v decembrski morski vodi (31,1 % bakterijske populacije) je bil njihov delež v delcih decembrskega morskega snega precej nižji (10,8 %) (Slika 5.10). Ravno obratno je bil delež gamaproteobakterij zelo visok v avgustovskih agregatih (29,2 %), ter nižji v okolni vodi (8,3 %). V obeh sezonah gamaproteobakterije predstavljajo velik delež aktivne bakterijske združbe v morski vodi (december: 36,8 %; avgust: 37,3 %). Znotraj

gamaproteobakterij je zanimiv pojav velikega števila bakterij iz družine *Vibrionaceae* (15,7 %) v avgustovskih agregatih, medtem ko v vodnem stolpcu predstavljajo le 1,2 % celotne bakterijske populacije in v aktivni združbi morske vode niso bile zaznane (Slika 5.11). Najbolj razširjene znotraj gamaproteobakterij so bakterije iz skupine NOR5/OM60 (NOR5/OM60 clade), ki pripada redu *Alteromonadales*. Največji delež teh bakterij najdemo v decembrskem vzorcu morske vode (18,3 %), medtem ko je njihov delež v vzorcih morskega snega decembra (6,9 %) in avgusta (7,3 %) nižji. Ravno tako je njihov delež nižji v morski vodi avgusta (5,4 %), vendar kljub temu predstavljajo precejšen del aktivne bakterijske združbe v tem času (26,6 %). Decembra pa kljub njihovi razširjenosti niso tako aktivne (4,6 % aktivne bakterijske populacije). Nasprotno pa velja za predstavnike bakterijske skupine SAR86 (SAR86 clade), ki v decembrski vodi predstavljajo 5,6 % celotne bakterijske populacije ter kar 17,2 % aktivne bakterijske populacije. Poleti jih le v majhnem deležu najdemo v vzorcu agregatov (2,2 %) in v aktivni bakterijski populaciji (4,4 %). Poleg omenjenih skupin znotraj gamaproteobakterij najdemo še bakterije iz morske skupine E01-9C-26 (E01-9C-26 marine group), ki so rahlo bolj razširjene decembra, bakterije iz skupine SAR92 (*Alteromonadales*) ter nekatere druge predstavnike redu *Alteromonadales* (Slika 5.11).

Alfaproteobakterije so najbolj razširjene v morski vodi decembra, kjer predstavljajo 16 % celotne populacije, vendar le 6,2 % v vzorcu morskega snega. Alfaproteobakterije so bile bolj zastopane v makroagregatih avgusta (11,2 %), manjši pa je bil njihov delež v okolni vodi (7,7 %), vendar pa tako decembra kot avgusta predstavljajo enkrat večji delež aktivne populacije, kot bi pričakovali glede na njihovo razširjenost v morski vodi (december 33,3 %; avgust 18,4 %). Nabor bakterijskih skupin znotraj alfaproteobakterij je precej pester. Med njimi so najpogostejše zastopane skupine SAR11, *Rhodobacterales* (rod *Roseobacter* in ostali rodovi) in manj zastopane skupine *Rhodospirillales*, *Rickettsiales*, *Sphingomonadales*, *Caulobacterales* in *Rhizobiales* (Slika 5.11). Predstavniki skupine SAR11 niso bili opaženi v avgustovskih agregatih in so bili tudi sicer v naših vzorcih redki (1,5-3 %), predstavljajo pa velik delež (16,1 %) aktivne bakterijske populacije v decembrski morski vodi. Predstavniki rodu *Roseobacter* (*Rhodobacterales*) so bili prisotni le v aktivni populaciji tako decembra kot tudi avgusta (4,6 in 5,7 %), medtem ko so bili drugi predstavniki redu *Rhodobacterales* prisotni v morski vodi predvsem decembra (5,6

%) in v vzorcih agregatov avgusta (3,9 %). Njihov delež v aktivni populaciji morske vode decembra (9,2 %) je višji kot bi predvidevali iz njihove številčnosti.



Slika 5.11: Natančnejša filogenetska analiza najbolj številčnih bakterijskih skupin (>20 % bakterijske populacije) v vzorcih agregatov in okolne morske vode Tržaškega zaliva vzorčenih 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010.

(A) *Bacteroidetes*, (B) *Cyanobacteria*, (C) *Alphaproteobacteria*, (D) *Gammaproteobacteria*. Dolžine raznobarvnih delčkov horizontalnih stolpcov predstavljajo relativni delež bakterijskih skupin glede na celotno bakterijsko populacijo v posameznem vzorcu. AW: vzorec morske vode, MS: vzorec morskih agregatov, DNA: gen 16S rRNA - predstavlja prisotno bakterijsko združbo, RNA: 16S rRNA – predstavlja aktivno bakterijsko združbo.

Figure 5.11: Comprehensive phylogenetic classification of the most abundant (>20 % of clones) bacterial groups in aggregates and surrounding seawater in the Gulf of Trieste collected 10th December 2009 and 26th August 2010.

(A) *Bacteroidetes*, (B) *Cyanobacteria*, (C) *Alphaproteobacteria*, (D) *Gammaproteobacteria* Lengths of differently colour –coded bar sections match the proportion of clones affiliated to each specific phylogenetic group as compared to the total number of clones in each corresponding clone library. AW: seawater sample, MS: particle enriched sample, rDNA: 16S rRNA genes, rRNA: 16S rRNA.

Poleg opisanih štirih najpogostejše zastopanih bakterijskih skupin, smo v vzorcih agregatov in okolni vodi zaznali tudi skupine bakterij, ki se pojavljajo v nižjih deležih (predstavljajo od 5 % do 20 % bakterijske populacije v analiziranih vzorcih), kot so *Actinobacteria*,

Firmicutes, *Planctomycetes* (Slika 5.10). Aktinobakterije so bile bolj razširjene (16 %) in bolj aktivne (10,3 %) v morski vodi decembra kot avgusta (4,8 %), njihov delež v morskem snegu je bil v obeh letnih časih zelo nizek (~1 %). Bakterije iz skupin *Firmicutes* in *Planctomycetes* so bile bolj pogoste decembra in sicer v morskem snegu in manj v okolni vodi, ter povsem nezaznavne v aktivni združbi.

Bakterije, z zelo nizko zastopanostjo v genskih knjižnicah (< 5 %) so bile najdene predvsem v decembrskih vzorcih morskega snega in vode, kjer je bila bakterijska združba tudi bolj bogata in je bila ocenjena razporejenost bakterij po vrstah bolj enakomerna (Preglednica 5.6). Manj številčne skupine, ki smo jih zasledili samo v decembrskih vzorcih so bile *Acidobacteria*, *Deferribacteres*, *Gemmatimonadetes*, *Betaproteobacteria*, in *Epsilonproteobacteria*. Edina skupina, ki smo jo zaznali le avgusta ne pa tudi decembra je *Synergistetes*. Medtem ko so bile bakterije iz skupin *Chlorobi*, *Verrucomicrobia* in *Deltaproteobacteria* opažene v obeh sezonah, vendar so bolj razširjene v morskem snegu in agregatih ter manj v okolni vodi.

5.3.2.2 Pestrost arhejske združbe v morskih agregatih in okolni vodi

Analiza genskih knjižnic arhejskih 16S rRNA genov je pokazala zelo nizko pestrost vrstne sestave arhejske združbe v vseh treh preučevanih vzorcih (Preglednica 5.7). Še posebej nizka je ta v poletnem času, ko smo v vodi zaznali eno samo OTU enoto (97 % podobnost), ki predstavlja arheje iz rodu *Nitosopumilus* (Slika 5.12). Največjo pestrost arhejske združbe smo zaznali v vzorcu decembrskega morskega snega ($D = 3,5$; $H' = 1,7$), kjer smo kljub prevladi zaporedij sorodnih genskemu zaporedju arheje *N. maritimus* ter za talno skupino značilnih predstavnikov *Thaumarchaeota* (Soil group I.1b), zaznali tudi prisotnost nekaterih arhejskih vrst iz debel *Crenarchaeota* in *Euryarchaeota*, ki so značilne za vzorce prsti, sedimenta ter anoksična okolja. Nekatere izmed teh smo zasledili tudi v decembrski morski vodi.

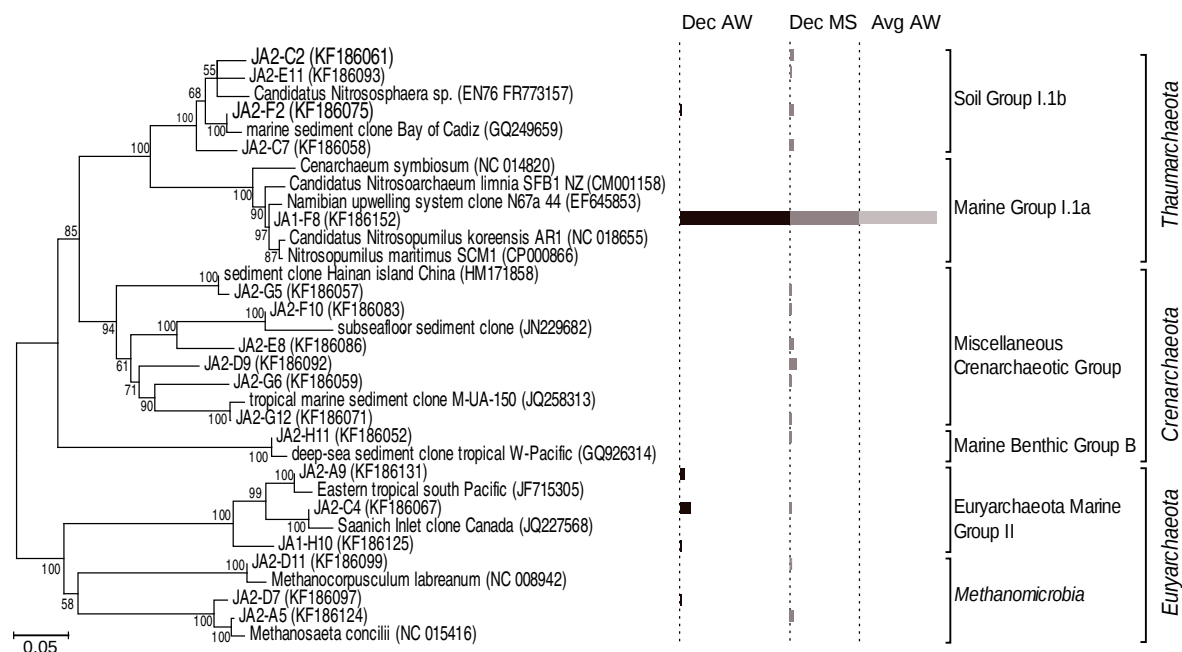
Preglednica 5.7: Pregled kazalcev vrstne diverzitete, pestrosti, ocenjene diverzitete in enakomernosti porazdelitve vrst v arhejskih genskih knjižnicah 16S rDNA iz vzorcev morskega snega in okolne vode v Tržaškem zalivu.

Podane so velikosti genskih knjižnic (N) in število OTU enot ki združujejo sekvence na podlagi 97 % podobnosti. Vzorci nabrani decembra 2009 so označeni z Dec, nabrani avgusta 2010 pa z Avg. AW: vzorci morske vode, MS: vzorci morskega snega in agregatov. n.a.-ni mogoče izračunati.

Table 5.7: Diversity indices calculated based on archaeal 16S rRNA clone libraries obtained from samples of marine snow and surrounding seawater from the Gulf of Trieste.

Table shows the number of obtained sequences per each clone library (N) and number of OTUs based on 97 % sequence similarity. Dec: December 2009, Avg: August 2010, AW: seawater sample, MS: particle enriched sample, rDNA: 16S rRNA genes, rRNA: 16S rRNA. n.a.- not applicable

Vzorec	Število sekvenc (N)	Število OTU enot (S)	Ocenjena diverziteta (Chao1)	Margalefov kazalec pestrosti (D)	Shannonov kazalec vrstne diverzitete (H'(log e))	Pieloujev kazalec enakomernosti porazdelitve vrst (J')
16S rDNA Dec AW	60	6	7,PJ5	1,2	0,68	0,38
16S rDNA Dec MS	53	15	20	3,5	1,7	0,62
16S rDNA Avg AW	35	1	1	0	0	n.a.



Slika 5.12: Z metodo združevanja sosedov (angl. Neighbour-Joining) izdelano filogenetsko drevo arhejske združbe pridobljene iz agregatov in okolne vode v Tržaškem zalivu vzorčene 10. decembra 2009 in 26. avgusta 2010.

Horizontalni stolpci na desni strani drevesa predstavljajo število posameznih sekvenc znotraj iste OTU skupine, z najdaljšim številom sekvenc 50 v decembrskem vzorcu morske vode (črno, Dec AW) in 32 sekvenc iz agregatov (temno sivi, Dec MS), ter 35 sekvenc v vzorcu morske vode avgusta (svetlo sivo, Avg MS). Referenčne sekvence pridobljene iz baze podatkov GenBank so zapisane z odebeljenimi črkami. Oklepaji na desni strani slike označujejo taksonomsko uvrstitev posameznih klastrov. Vrednosti Bootstrap analize večje od 50 so prikazane ob razvejitvah.

Figure 5.12: Neighbour-joining tree representing phylogenetic relationships among archaeal 16S rDNA sequences in aggregates and surrounding sea water collected in the Gulf of Trieste on 10th of December 2009 and 26th of August 2010.

Bars indicate the number of sequences per OTU, scaled to the maximum of 50 clones from December seawater sample (black, Dec AW) and 32 from particle-associated (dark grey, Dec MS) and 35 clones from August seawater sample (light grey, Avg AW). Reference sequences obtained from GenBank are shown in bold. Brackets on the right side indicate phylogenetic affiliation. Bootstrap values higher than 50 are shown at branch points.

5.4 IZOLACIJA AMONIJ- OKSIDIRAJOČE ARHEJE

Fiziološke in genomske značilnosti morskih amonij-oksidirajočih arhej smo proučevali v čisti kulturi izoliranega predstavnika AOA, da bi dobili boljši vpogled v fiziologijo in evolucijo teh še ne povsem raziskanih mikroorganizmov. Uporabili smo več različnih gojišč, ki smo jih v prvem poizkusu nacepili z vzorcem večjih organskih agregatov, ki se v Tržaškem zalivu najpogosteje pojavljajo v poletnih mesecih, v drugem poizkusu pa z morsko vodo, ki smo jo vzorčili v neposredni bližini Morske biološke postaje v Piranu v mesecu novembru in decembru 2011.

Rast amonij- oksidirajočih prokariontov v kulturi smo spremljali s pomočjo merjenja koncentracij nutrientov. Kot je bilo to pokazano v primeru arheje *Nitrosopumilus maritimus*, AOA v čisti kulturi skoraj stehiometrično pretvarja NH_4^+ v NO_2^- , tako nam spremljanje teh dveh nutrientov omogoča spremljanje rasti AOA. V kolikor bi bile v kulturi prisotne bakterije, ki oksidirajo NO_2^- do NO_3^- , bi prišlo do kopičenja slednjega pri porabi NH_4^+ . To bi se lahko dogajalo sploh v začetni fazi bogatitve, ko je pestrost mikrobne združbe v kulturi večja. Zato smo v začetni fazi spremljali tudi koncentracijo NO_3^- .

5.4.1 Izolacija in priprava kulture v bogatitvenem gojišču

5.4.1.1 Obogatitev AOA iz agregatov Tržaškega zaliva

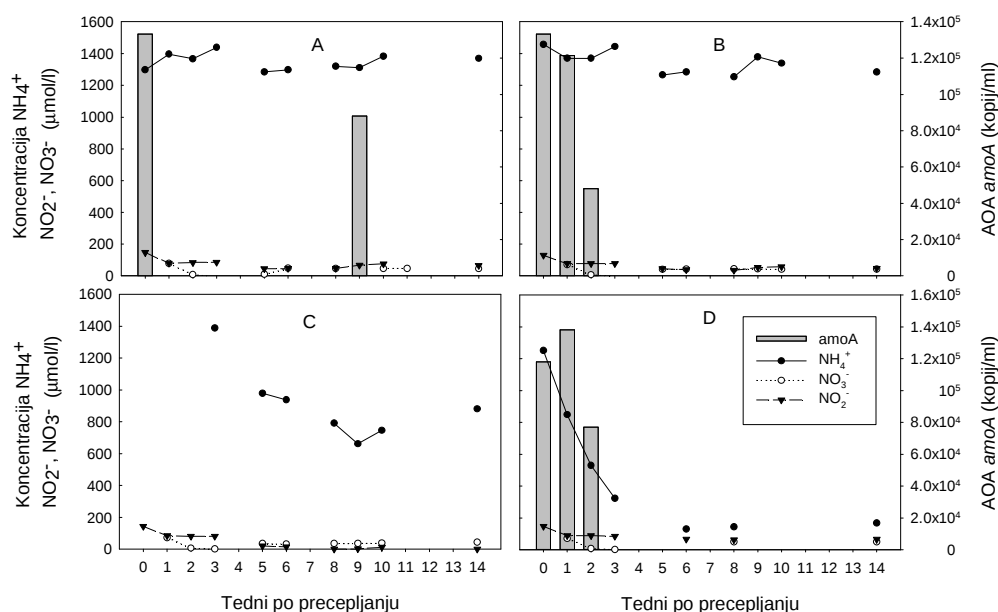
V prvem laboratorijskem poskusu smo obogatili AOA po inokulaciji agregatov v bogatitvenem gojišču za združbe nitrifikatorjev MAM (Marine AO Medium). Agregate je vzorčil potapljač s sterilno siringo, 26. 8. 2010 na globini 13 m v Tržaškem zalivu (postaja 00BF). V pripravljeno gojišče smo nacepili različne volumne agregatov (10 ml – Par10 in 100 ml – Par100) in gojišče inkubirali v temi pri temperaturi 17 °C. Predvidevali smo, da bomo na ta način izolirali AOA in β AOB prisotne v morski vodi in agregatih.

Začetna koncentracija NH_4^+ v gojišču je znašala 7,56 mmol/l. Po treh mesecih inkubacije smo v obeh kulturah (Par10 in Par100) zaznali porast NO_3^- od začetne koncentracije 5,1 –

5,7 $\mu\text{mol/l}$ do 447,2 $\mu\text{mol/l}$ v kulturi Par10 ter do 1226,4 $\mu\text{mol/l}$ v kulturi Par100, kar je nakazovalo prisotnost združbe nitrifikatorjev. Kljub manjši nitrifikacijski aktivnosti smo v nadaljevanju uporabili samo kulturo Par10, v izogib morebitni inhibiciji pri pomnoževanju DNA. Iz kulture Par10 smo izolirali DNA in z metodo qPCR preverili prisotnost arhejskega in betaproteobakterijskega gena *amoA*. Izkazalo se je, da so za oksidacijo NH_4^+ v kulturi odgovorne AOA, saj je koncentracija arhejskega gena *amoA* v kulturi znašala $5,8 \times 10^6 \pm 4 \times 10^4$ kopij/ml, medtem ko je bila koncentracija betaproteobakterijskega gena *amoA* pod mejo detekcije metode qPCR.

Po prvem precepljanju kulture Par10 v sveže MAM gojišče s koncentracijo NH_4^+ 1,7 mmol/l smo na 2-4 tedne spremljali spremembe koncentracij NH_4^+ , NO_3^- in NO_2^- v gojišču. Ker porabe NH_4^+ nismo zaznali, smo kulturo Par10 ponovno precepili in inkubirali v modificiranem gojišču SCM (Synthetic Creanarchaeota Medium) z dodatkom morske vode (10 %). Inkubacija je potekala pri dveh različnih temperaturah (17 °C in 25 °C), pri dveh različnih pH vrednostih (7,3 in 7,6) in v prisotnosti antibiotika ampicilina (končna koncentracija 100 $\mu\text{g/ml}$) (Slika 5.13).

Pri nobenem od testiranih rastnih pogojev v kulturi nismo zaznali povišani koncentracij NO_2^- ali NO_3^- . Ravno tako v primeru nižje pH vrednosti nismo zaznali porabe NH_4^+ , medtem ko se je v gojišču z višjo pH vrednostjo ter v kulturi z dodatkom antibiotika koncentracija NH_4^+ zmanjševala. V vseh testiranih kulturah se je koncentracija arhejskega gena *amoA* v kulturi zniževala. Zaradi neuspeha smo nadaljnje poizkuse oživitve opustili.



Slika 5.13: Spremljanje rasti kultur amonij- oksidirajoče arheje pridobljenih iz morskega agregata po precepljanju v modificirano SCM gojišče in gojenju pri različnih pogojih.

Pogoji gojenja so bili sledeči: (A) 17 °C, pH 7'35; (B) 25 °C, pH 7'35; (C) 25 °C, pH 7'6; (D) 25 °C, pH 7'35 + ampicilin.

Figure 5.13: Monitoring of the growth of Crenarchaeota enrichment culture obtained from macroaggregate, after the transfer to modified SCM medium and explosion to different growth conditions.

Growth conditions was as follows: (A) 17 °C, pH 7'35; (B) 25 °C, pH 7'35; (C) 25 °C, pH 7'6; (D) 25 °C, pH 7'35 + ampicilin.

Kljub neuspeli revitalizaciji smo arhejske celice v kulturi Par10 zaznali z metodo CARD-FISH še po skoraj letu dni od prve inokulacije v koncentraciji $5,1 \times 10^6$ celic/ml, kar je predstavlja od 75 do 89 % vseh prokariontskih celic v kulturi.

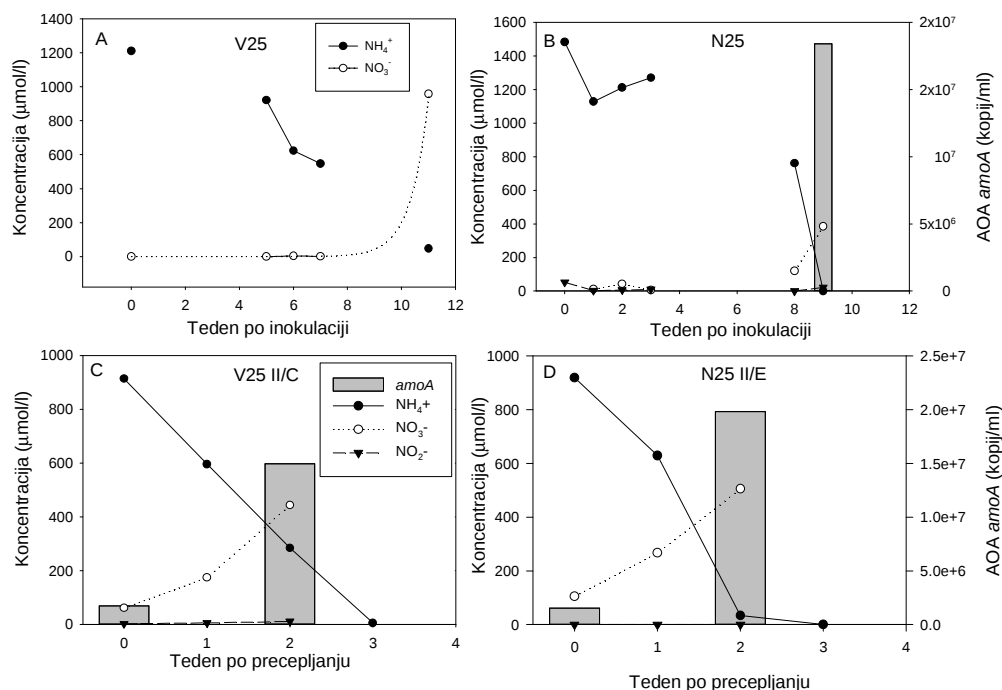
5.4.1.2 Obogatitev AOA iz morske vode Tržaškega zaliva

Morsko vodo, ki smo jo vzorčili v obalnem pasu morja pred Morsko biološko postajo v Piranu novembra (N25) in decembra 2011 (V25) smo inokulirali v modificirano gojišče SCM, ki so ga uporabili pri izolaciji prve izolirane morske arheje *Nitrosopumilus maritimus* iz vode morskega akvarija (Konneke in sod., 2005).

Kulture smo inkubirali pri temperaturi 25 °C (N25 in V25) in po dveh mesecih zaznali znižanje koncentracij NH_4^+ , od začetne koncentracije 1,2 -1,4 mM do 761 μM v primeru kulture N25 in 547 μM v primeru kulture V25. Koncentracije NO_3^- so se povišale po 11 tednih inkubacije. V primeru kulture V25 se je povečala tudi koncentracija NO_2^- . Nitrita v kulturi na samem začetku postopka bogatitve nismo pričakovali, saj smo predvidevali da je v kulturi še vedno prisotna bakterijska združba, ki vrši proces oksidacije NO_2^- do NO_3^- , ki poteka hitreje od nastanka NO_2^- v procesu oksidacije amonija.

Upad koncentracije amonija smo opazili tudi v kulturah, ki so bile inkubirane pri temperaturi 17 °C, vendar je bil ta mnogo počasnejši, kot v primeru N25 in V25 (podatki niso prikazani), zato smo se v nadaljevanju osredotočili na kulturi N25 in V25 in ju tekom nadaljnjega postopka bogatitve inkubirali pri temperaturi 25 °C.

Iz kulture celic novembrskega vzorca (N25) smo izolirali DNA po devetih tednih in potrdili prisotnost arhejskega gena *amoA* v koncentraciji $1,8 \times 10^7$. V obeh kulturah smo z metodo CARD-FISH potrdili prisotnost arhejskih celic MGI, ki bi lahko predstavljale potencialnega kandidata za oksidacijo amonija, ki smo jo zaznali v kulturah v času inkubacije. Glede na določeno število arhejskih in bakterijskih celic smo ocenili, da v kulturah prevladuje arhejska združba (70 -80 %).

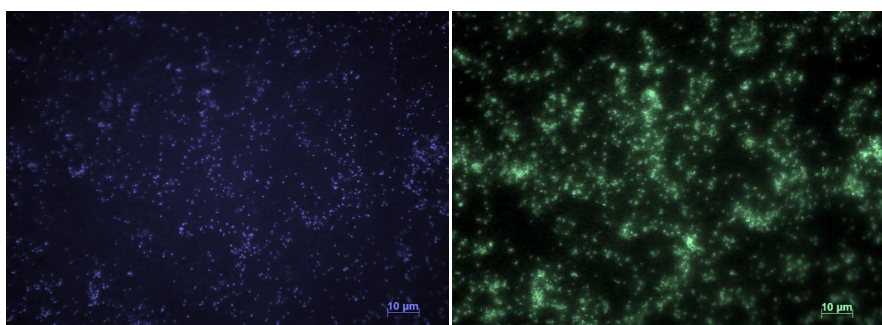


Slika 5.14: Koncentracije AOA genov *amoA* in dušikovih spojin v kulturi V25 (A) in N25 (B) po prvem nacepljanju morske vode Tržaškega zaliva in prvem precepljanju (druga generacija V25 (C) in N25 (D)).

Kulturi sta bili inkubirani v mSCM gojišču pri 25 °C.

Figure 5.14: Concentrations of AOA *amoA* genes and nitrogen compounds in cultures V25 (A) and N25 (B) after the first inoculation of the seawater of the Gulf of Trieste and after the first transference (second generation: V25 (C) and N25 (D))

Cultures were incubated in mSCM at 25 °C.



Slika 5.15: Epifluorescentni mikroskopski posnetek celic prokariontske združbe kulture N25.

Posnetek istega vidnega polja: vseh celic označenih z barvilom DAPI (levo) in *Crenarchaeota* celic označenih z nukleotidnimi sondami Cren537 in Cren554, (desno) po CARD-FISH hibridizaciji.

Figure 5.15: Epifluorescence microscope images of prokaryotic community in the enriched culture N25
Identical fields of view of cells stained with DAPI (left) and stained *Crenarchaeota* cells visualised by hybridization with nucleotide probes Cren537 and Cren554 (right) after CARD-FISH hybridization.

Kljub potrjeni visoki koncentracije AOA gena *amoA* in števila arhejskih celic v kulturi, smo preverili prisotnost β AOB v obeh kulturah (N25 in V25) z metodo PCR. Rezultati so potrdili odsotnost betaproteobakterijskih genov *amoA* v obeh kulturah, kot tudi v 2 in 3 generaciji kultur.

5.4.2 Povečevanje koncentracij AOA v kulturi

Da bi povečali odstotek arhejskih celic v kulturi in zavrli rast bakterijskih celic, smo ob precepljanju kulture v sveže gojišče, le temu dodali različne antibiotike (streptomycin, kanamicin, eritromicin in tetraciklin) in filtrirali inokulum skozi nitrocelulozni filter z velikostjo por 0,45 μm , da bi s tem zmanjšali število bakterijskih celic ob prenosu kulture v sveže gojišče.

Hitrost oksidacije smo spremljali z meritvami koncentracij NH_4^+ in nastalega NO_2^- ter s štetjem celic pod mikroskopom (Preglednica 5.8). Na osnovi pridobljenih rezultatov smo v nadaljevanju uporabljali antibiotik, ki ni zaviral oksidacije amonija in je omogočal čim bolj stehiometrično oksidacijo NH_4^+ v NO_2^- , preprečili pa smo razmnoževanje oziroma delovanje nitrit oksidirajočih bakterij. Na podlagi teh kriterijev in doseženi stopnji povečanja števila celic v kulturi, smo dobili najboljše rezultate z dodatkom kanamicina, streptomicina in eritromicina.

Filtracija inokuluma skozi 0,45 μm filter se ni izkazala kot primerna metoda za bogatenje kulture.

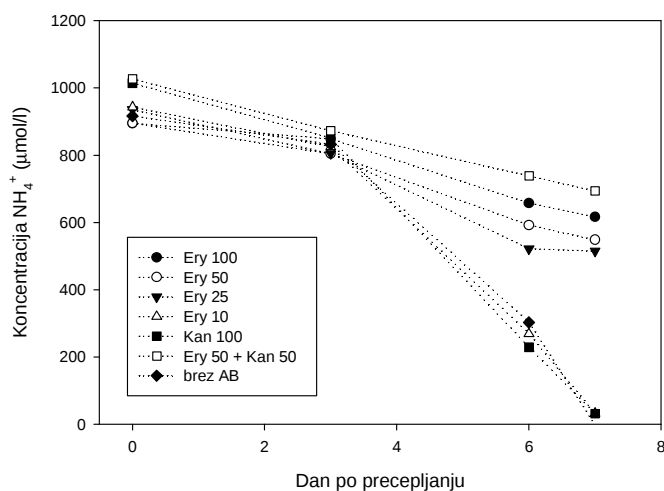
Preglednica 5.8: Spremljanje rasti kulture po dodatku antibiotika oziroma po predhodni filtraciji inokuluma skozi 0,45 μm filter. Vsi antibiotiki so bili dodani v končni koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$.

Table 5.8: Monitoring of growth of cultures after addition of different antibiotics or filtering the inoculum through 0,45 μm filter. All antibiotics were supplemented in concentration 100 $\mu\text{g/ml}$.

	koncentracij NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$)			poraba NH_4^+ ($\mu\text{mol/L}$)	koncentracija NO_2^- ($\mu\text{mol/L}$)	obogatenost kulture z AOA
	Dan 1	Dan 6	Dan 9	Dan 9	Dan 9	Cren (% DAPI)
ampicilin_1	968	933	814	154	31	46
ampicilin_2	959	917	864	96	29	48
karbenicilin_1	989	860	707	282	124	nizka
karbenicilin_2	998	839	510	488	316	nizka
streptomycin_1	944	708	157	787	671	85
streptomycin_2	984	698	149	836	724	80
kanamicin_1	948	715	167	781	685	92
kanamicin_2	985	739	133	853	178	55
tetraciklin	1161	1011	902	260	34	50
eritromicin	915	658	218	697	506	77
neg. kontrola_1	996	726	255	741	39	52
neg. kontrola_2	1026	768	303	723	42	/
0.45 μm filtrat	915	864	720	195	121	35

Kljub obetavnim rezultatom se je streptomycin naknadno izkazal za neprimerne, saj so arheje v naslednji generaciji od dodatka antibiotika, postale neaktivne. Zato smo njegovo uporabo opustili. Zaradi slabe topnosti smo imeli težave tudi pri uporabi eritromicina, ki se sicer uporablja za specifično določanje stopnje arhejske nitrifikacije v okoljskih vzorcih morske vode v koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$. Sklepali smo da je bila testirana koncentracija zaradi slabe topnosti eritromicina v kulturi nižja od 100 $\mu\text{g/ml}$. Antibiotik smo zato pripravili v založni raztopini z nižjo koncentracijo ter s segrevanjem na 30 °C pospešili raztapljanje. Nato smo preverili delovanje tega antibiotika pri različnih končnih koncentracijah. Izkazalo se je, da eritromicin v koncentracijah 25, 50 in 100 $\mu\text{g/ml}$ zavira oksidacijo amonija v kulturi. Oksidacija NH_4^+ je potekala nemoteno le pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$. Vendar pa zaviranja rasti bakterij pri tej koncentraciji eritromicina nismo opazili, zato smo njegovo uporabo opustili. Pri vseh nadaljnjih precepljanjih kulture smo v gojišče dodali kanamicin v končni koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$, saj se je izkazalo, da le te ne vpliva na

hitrost in zmožnost oksidacije amonija ter uspešno zavira rast bakterij. Kljub temu so nekatere bakterije, ki so očitno odporne na delovanje kanamicina, ostale prisotne v kulturi v nizkem številu (2-5 %) tudi po 30 generacijah.



Slika 5.16: Spremljanje oksidacije NH_4^+ po dodatku različnih končnih koncentracij antibiotika eritromicin.

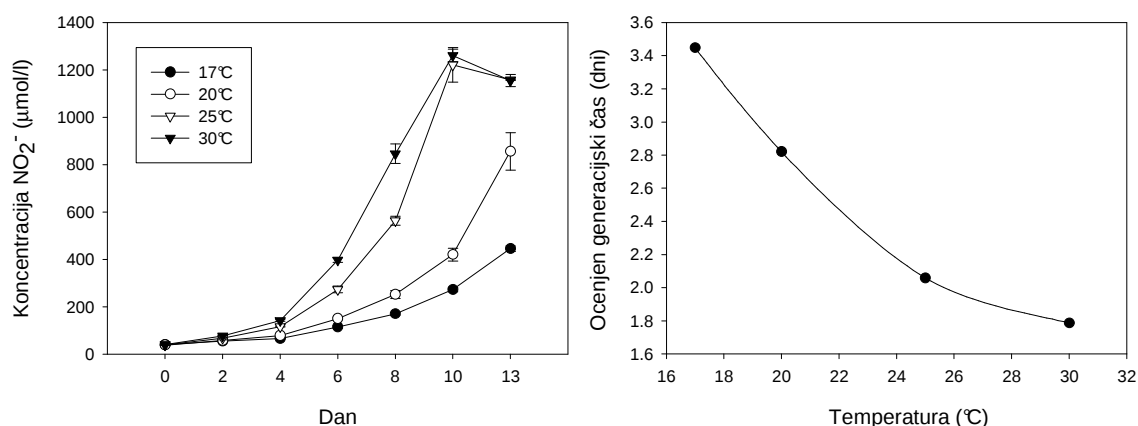
Kot negativno kontrolo smo spremljali kulturo z dodatkom kanamicina (Kan 100) ter kulturo brez dodanega antibiotika (brez AB).

Figure 5.16: Monitoring of ammonia oxidation in cultures after addition of different concentrations of erithromicyn.

As a negative controle we analysed a culture with added kanamicyn (Kan 100) and culture without added antibiotic (brez AB)

5.4.3 Določanje optimalnih pogojev za rast kulture AOA

Da bi določili optimalne pogoje za rast kulture AOA smo spremljali porast koncentracij NO_2^- pri različnih pH vrednostih gojišča (6,5; 7,0; 7,5; 8,0 in 8,5) in različnih temperaturah (17, 20, 25, 30, 37 °C). Vse teste smo izvedli v treh paralelkah kulture, generacijski čas pa smo določili iz naklona krivulje, ki podaja log-transformirano količino nastalega NO_2^- v odvisnosti od časa v eksponentni fazi rasti. Optimalna temperatura za rast kulture arheje N25 je 30 °C, ker je bil pri tej temperaturi ocenjen najkrajši generacijski čas. Optimalna temperatura bi lahko morda celo presegala 30 °C, vendar pa je bila rast pri 37 °C popolnoma zaustavljena (podatki niso prikazani).



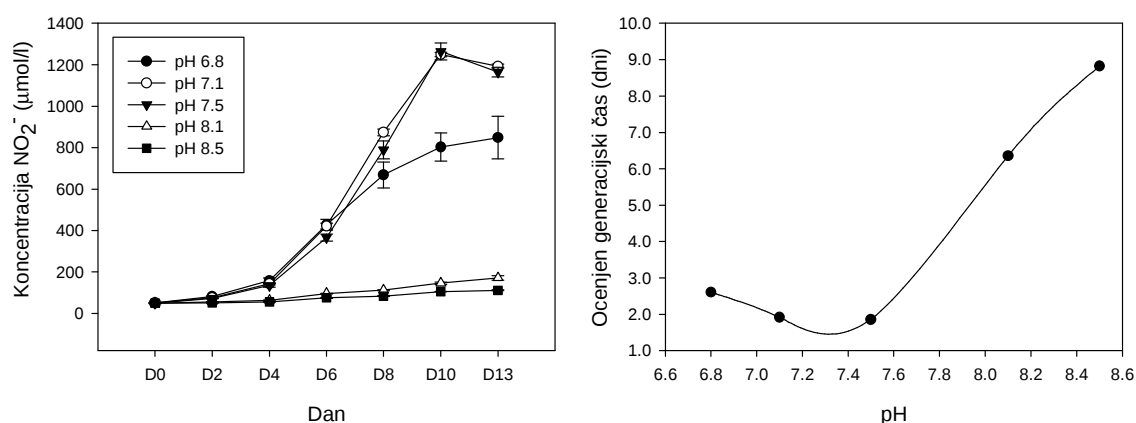
Slika 5.17: Rast arhejske kulture N25 pri različnih temperaturah in ocenjen generacijski čas.

Meritve koncentracij NO_2^- v času inkubacije (levo), generacijski čas je bil ocenjen iz naklona krivulje, ki podaja ln-transformirano produkcijo nitrita po času, med eksponentno fazo (desno).

Figure 5.17: Growth of *Crenarchaeota* culture N25 at different temperature and estimated generation time.

Measurements of NO_2^- concentrations (left) during the time of incubation, generation time was estimated from the slope of the ln-transformed nitrite production measurements during exponential growth (right).

Koncentracije NO_2^- so najbolj naraščale v kulturi s pH vrednostjo 7,1 in 7,5, medtem ko so bile koncentracije NO_2^- skoraj nespremenjene pri pH vrednosti nad 8 vseh 13 dni inkubacije. Na podlagi tega sklepamo, da je optimalna pH vrednost za rast kulture AOA med 7,1 - 7,5.



Slika 5.18: Rast arhejske kulture N25 pri različnih pH vrednosti gojišča

Meritve koncentracij NO_2^- v času inkubacije (levo), generacijski čas je bil ocenjen iz naklona krivulje, ki podaja ln-transformirano produkcijo nitrita po času, med eksponentno fazo (desno).

Figure 5.18: Growth of *Crenarchaeota* culture N25 at different pH value of medium.

Measurements of NO_2^- concentrations (left) during the time of incubation, generation time was estimated from the slope of the ln-transformed nitrite production measurements during exponential growth (right).

5.4.4 Dinamika rasti AOA v visoko obogateni kulturi

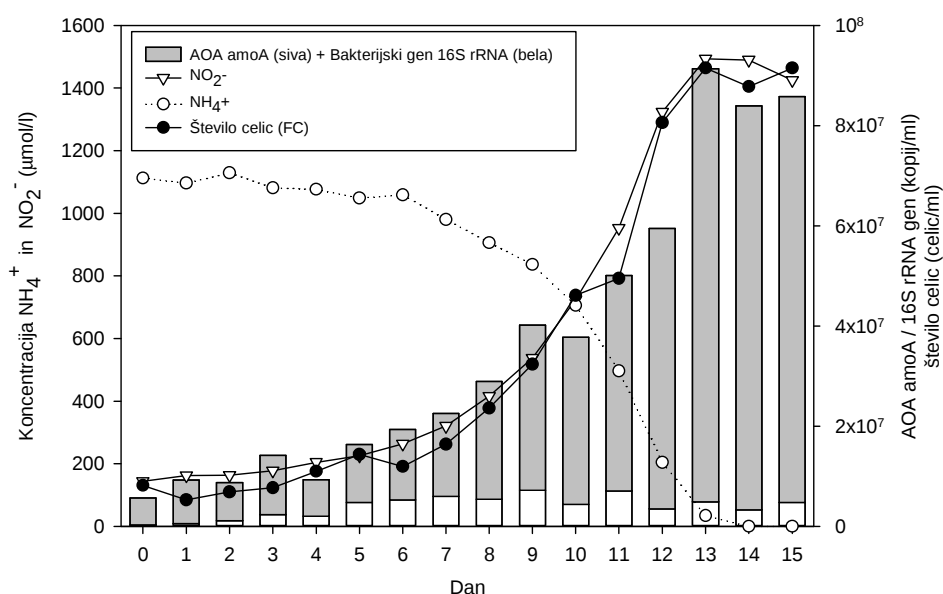
Po 17-ih precepljanjih (17 generacij) kulture N25, ko je bila ta že visoko obogatena z AOA (>95 %), smo njeno rast spremljali v krajših časovnih intervalih, da bi preverili kako je povezan proces oksidacije amonija do nitrita z rastjo arheje v kulturi.

Volumen začetnega inokuluma smo prilagodili gostoti celic, tako da je koncentracija gena *amoA* ob začetku inkubacije v obeh primerih znašala približno 5×10^6 kopij / ml. V prvem primeru je inokulum tako predstavljal 5 % začetne kulture v drugem pa 10 %. V obeh primerih smo zaznali stehiometrično pretvorbo NH_4^+ v NO_2^- ter produkciji NO_2^- premosorazmerno naraščanje števila celic ter koncentracije arhejskega gena *amoA*.

V prvem primeru (Slika 5.19), smo poleg zgoraj navedenih parametrov s pretočno citometrijo določili tudi koncentracijo vseh celic v kulturi, da bi preverili zanesljivost ocenjevanja koncentracije AOA na podlagi gena *amoA*. Določili smo tudi koncentracijo bakterijskega gena 16S rRNA, da bi preverili dinamiko rasti bakterij, ki so še prisotne v kulturi.

Začetna koncentracija NH_4^+ je v prvem primeru znašala 1,1 mmol/l, začetna koncentracija NO_2^- pa 0,144 mmol/l. Po 14 dneh inkubacije je prišlo do popolne porabe amonija in je koncentracije NO_2^- znašala 1,49 mmol/l. Celokupno število celic in koncentracij gena *amoA*, je začelo eksponentno naraščati 5 dan inkubacije. Konec eksponentne in začetek stacionarne faze rasti je nastopil po 13 dneh inkubacije, ob tem je število kopij gena *amoA* v kulturi doseglo najvišjo vrednost $8,7 \times 10^7$ kopij/ml. Koncentracija vseh celic v kulturi določena s pretočno citometrijo je ob tem znašala $9,2 \times 10^7$ celic/ml, kar ustreza vsoti števila kopij arhejskega gena *amoA* ter števila kopij bakterijskih genov 16S rRNA ($4,9 \times 10^6$ kopij/ml) na mililiter kulture v isti časovni točki.

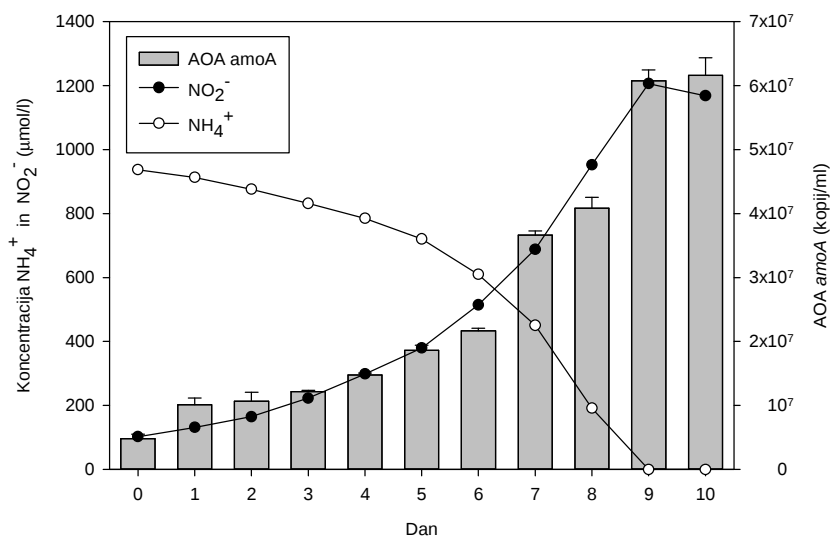
Vendar to ne drži za vse časovne točke, kar bi lahko pomenilo da je pri izolaciji DNA iz kulture prišlo do izgub ali da smo na podlagi števila kopij enega od genov precenili število prisotnih arhejskih ali bakterijskih celic v kulturi. Koncentracija bakterijskega gena 16S rRNA je bila najnižja ob začetku inkubacije ($3,1 \times 10^5$ kopij/ml) in je konstantno naraščala do začetka eksponentne faze rasti arheje (dan 5). V naslednjih dneh koncentracija ni več naraščala in se je ob koncu inkubacije celo nekoliko znižala. Po koncu eksponentne faze rasti opazimo tudi zniževanje koncentracije genov *amoA*, kar nakazuje na odmiranje AO arhejskih celic v stacionarni fazi.



Slika 5.19: Prvi primer rastne krivulje arheje v visoko obogateni kulturi N25 in potek oksidacije amonija do nitrita pri 25 °C.

Figure 5.19: First example of the growth curve of *Crenarchaeota* in highly enriched culture N25 and the course of ammonia oxidation to nitrate at 25 °C.

V drugem primeru, ko je inokulum predstavljal 10 % začetne culture, je bila začetna koncentracija NH_4^+ v gojišču 0,94 mmol/l, začetna koncentracija NO_2^- pa 0,103 mmol/l (Slika 5.19). Lag faza ali faza prilagajanja je bila v tem primeru krajša oziroma je sploh nismo zaznali, saj je koncentracija gena *amoA* začela takoj po precepljanju naraščati. Celice so dosegle stacionarno fazo rasti po 9 dneh inkubacije, ko je bil oksidiran ves NH_4^+ in je koncentracija NO_2^- znašala 1,17 mmol/l. Koncentracija AOA gena *amoA* v gojišču je v tej časovni točki znašala $6,1 \times 10^7$ kopij/ml.



Slika 5.20: Drugi primer rastne krivulje arheje v visoko obogateni kulturi N25 in potek oksidacije amonija do nitrita pri 25 °C.

Figure 5.20: second example of the growth curve of *Crenarchaeota* in highly enriched culture N25 and the course of ammonia oxidation to nitrate at 25 °C.

Hitrost rasti v eksponentni fazi je bila v prvem primeru, kjer je bila lag faza dolga 5 dni, nekoliko nižja (0,24 /dan), kot v drugem primeru (0,27 /dan) (Preglednica 5.9). Generacijski čas je v prvem primeru znašal 2,9 dni, v drugem pa 2,6 dni. Ne glede na to pa sta oba generacijska časa več kot 2x daljša, kot generacijski čas določen pri arheji *N. maritimus*.

Preglednica 5.9: Generacijski čas, hitrost rasti in specifična hitrost oksidacije amonija v kulturi N25 v primerjavi z arhejo *N. maritimus*.* - povzeto po Martens-Habbena in sod. 2009.

Table 5.9: Generation time, Growth rate and Cell specific ammonia oxidation rate in culture N25 in comparison with *N. maritimus*. *- from Martens-Habbena et al. 2009.

Parameter	Oznaka (Enota)	N25 I (25 °C)	N25 II (25 °C)	<i>N. maritimus</i> (30 °C)*
Hitrost rasti (growth rate)	μ (dan ⁻¹)	0,24	0,27	0,65
Generacijski čas	g (dni)	2,9	2,6	1,1
Celično specifična hitrost oksidacije amonija	(fmol NO ₂ ⁻ /celico/dan)	7,5	6,8	13

5.4.5 Taksonomska uvrstitev obogatenih sevov AOA

Vse AO arheje, ki smo jih tekom raziskovalnega dela uspeli pridobiti v obogatenih kulturah (Par10, N25 in V25) se filogenetsko uvrščajo v rod *Nitrosopumilus*, katerega predstavnik je *N. maritimus* SCM1, ki je bil kot prva AO arheja izoliran v čisti kulturi (Konneke in sod., 2005). Arheji iz obogatenih kultur N25 in Par10 se na podlagi gena 16S rRNA med seboj skoraj ne razlikujeta (0,01%), vendar se od arheje iz kulture V25 razlikujeta za 1%. Ta razlika bi lahko že pomenila dve različni vrsti.

Preglednica 5.10: Rezultati primerjave sekvenc gena za 16S rRNA iz obogatenih kultur AOA s sekvencami v bazi podatkov GenBank.

Za vsako kulturo je navedenih pet najbolj sorodnih organizmov iz baze podatkov GenBank, podobnost ter identifikacijska številka posamezne sorodne sekvence.

Table 5.10: Blast results of 16S rRNA gene sequences obtained from AOA enrichment cultures against the sequences in GenBank database.

For each enrichment culture five closest relatives according to GenBank database are given, together with the % of similarity and accession number.

	Najbližji sorodnik v bazi GenBank	Podobnost	Id. Št. (ang. Accession No.)	Izvor
N25	<i>Ca. Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	99,0%	NC_018655.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Ca. Nitrosopumilus</i> sp. AR2	98,8%	NC_018656.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	98,8%	NC_010085.1	pesek v tropskem akvariju
	<i>Ca. Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	97,9%	NZ_CM001158	estuarski sediment (0,6 psu)
	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	94,7%	NC_014820.1	morska spužva
V25	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	99,7%	NC_010085.1	pesek v tropskem akvariju
	<i>Ca. Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	99,2%	NC_018655.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Ca. Nitrosopumilus</i> sp. AR2	99,1%	NC_018656.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Ca. Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	97,4%	NZ_CM001158	estuarski sediment (0,6 psu)
	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	94,2%	NC_014820.1	morska spužva
Par10	<i>Ca. Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	98,7%	NC_018655.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Ca. Nitrosopumilus</i> sp. AR2	98,6%	NC_018656.1	morski sediment (Svalbard)
	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	98,6%	NC_010085.1	pesek v tropskem akvariju
	<i>Ca. Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	97,7%	NZ_CM001158	estuarski sediment (0,6 psu)
	<i>Cenarchaeum symbiosum</i> A	94,5%	NC_014820.1	morska spužva

Na podlagi gena 16S rRNA arheja V25 izkazuje največjo sorodnost z *N. maritimus* (99,7 %), medtem ko sta arheji N25 in Par10 najbolj podobni (98,8 –99,0 %) arheji *Ca.*

Nitrosopumilus koreensis AR1, ki je bila obogatena iz morskega sedimenta na območju arktičnega kroga ob otočju Svalbard (Park in sod., 2012b). Nekoliko nižjo stopnjo podobnost najdemo med sekvencami naših AOA kultur in arhejo *Nitrosopumilus* sp. AR2 (*Ca. Nitrosopumilus sediminis*), ravno tako obogateno iz morskega sedimenta na območju arktičnega kroga (Park in sod., 2012a) (Preglednica 5.10). Še nekoliko nižjo podobnost zasledimo glede na arhejo *Ca. Nitrosoarchaeum limnia* SFB1 iz estuarskega sedimenta na območju z nizko slanostjo (~ 0,6 PSU) (Mosier in sod., 2012a) in arhejo *Crenarchaeum symbiosum* A, ki je simbiot na morski spužvi (Preston in sod., 1996).

Razlika med sekvencami gena *amoA* je večja kot v primeru genov 16S rRNA (Preglednica 5.11). Arheji iz obogatene kulture N25 in Par10 sta najbolj sorodni arktični arheji *Candidatus Nitrosopumilus* sp. AR2 (*Ca. Nitrosopumilus sediminis*; 95 % v obeh primerih), medtem ko je arheja iz kulture V25 najbolj podobna arheji *Ca. Nitrosopumilus koreensis* AR1, ki je bila prav tako izolirana iz sedimenta Arktičnega morja.

Preglednica 5.11: Rezultati primerjave sekvenc gena *amoA* iz obogatenih kultur AOA s sekvencami v bazi podatkov GenBank.

Za vsako od obogatenih kultur so navedeni štiri najbolj sorodnih organizmov iz baze podatkov, % podobnosti ter identifikacijska številka posamezne sorodne sekvence.

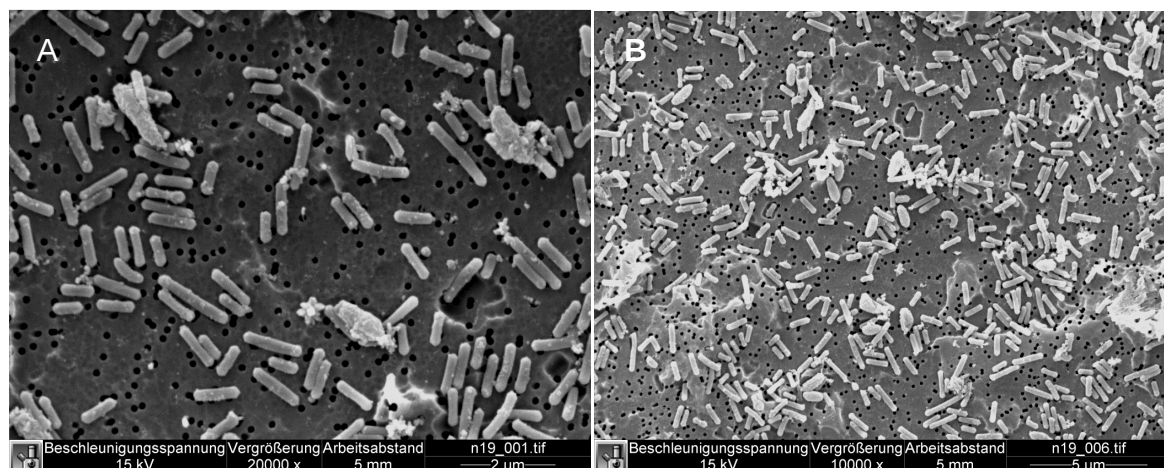
Table 5.11: Blast results of *amoA* gene sequences obtained from AOA enrichment cultures against the sequences in GenBank database.

For each enrichment culture four closest relatives according to GenBank database are given, together with the % of similarity and accession number.

	Najbližji sorodnik v bazi GenBank	Podobnost	Identifikacijska št. (ang. Accession No.)
N25	<i>Candidatus Nitrosopumilus</i> sp. AR2	95 %	NC_018656.1
	<i>Candidatus Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	94 %	NC_018655.1
	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	93 %	NC_010085.1
	<i>Candidatus Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	90 %	NZ_CM001158.1
V25	<i>Candidatus Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	97 %	NC_018655.1
	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	96 %	NC_010085.1
	<i>Candidatus Nitrosopumilus</i> sp. AR2	94 %	NC_018656.1
	<i>Candidatus Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	90 %	NZ_CM001158.1
Par10	<i>Candidatus Nitrosopumilus</i> sp. AR2	95 %	NC_018656.1
	<i>Candidatus Nitrosopumilus koreensis</i> AR1	94 %	NC_018655.1
	<i>Nitrosopumilus maritimus</i> SCM1	93 %	NC_010085.1
	<i>Candidatus Nitrosoarchaeum limnia</i> SFB1	90 %	NZ_CM001158.1

5.4.6 Morfologija v obogateni kulturi izoliranih arhej

Morfologijo celic v obeh kulturah, ki sta bili uspešno obogatene (N25 in V25) smo opazovali s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM). Tako v kulturi N25 (Slika 5.21), kot tudi v kulturi V25 (Slika 5.22) so prevladovali celice pravih paličastih oblik s premerom 0,4 μm , vendar različnih dolžin, od večinoma 1 μm do 2 μm ali več. Poleg prevladujočih paličic pa lahko opazimo tudi celice drugih oblik (kokobacili, vibriji in spirohete). Glede na to da gre za visoko obogateno kulturo AO arheje (~95 %) ter da je bil vzorec odvzet v pozni eksponentni fazi rasti, sklepamo, da so celice ki predstavljajo večji del populacije (paličaste) arhejske celice odgovorne za oksidacijo amonija.

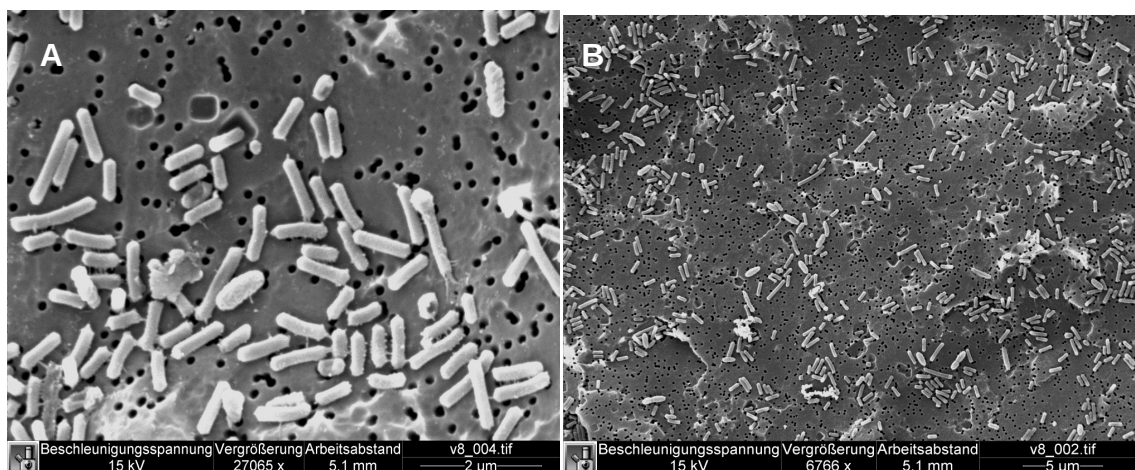


Slika 5.21: Elektronska posnetka vzorca kulture N25 v pozni eksponentni fazi rasti.

Elektromikrografiji sta posneti z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) pri 20000x povečavi (A), kjer dolžinska oznaka na sliki predstavlja 2 μm ter pri 10000x povečavi (B), kjer dolžinska oznaka predstavlja 5 μm .

Figure 5.21: SEM micrography of N25 culture in late exponential growth phase.

Electron micrographs were taken using scanning electron microscope (SEM) at magnifications of 20000x (A) and 10000x (B), where the scale bars represent 2 and 5 μm , respectively.



Slika 5.22: Elektronska posnetka vzorca kulture V25 v pozni logaritemski fazi rasti.

Elektromikrografiji sta posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) pri 20000x povečavi (A), kjer dolžinska oznaka na sliki predstavlja 2 µm ter pri 10000x povečavi (B), kjer dolžinska oznaka predstavlja 5 µm.

Figure 5.22: SEM micrography of N25 culture in late exponential growth phase.

Electron micrographs were taken using scanning electron microscope (SEM) at magnifications of 20000x (A) and 10000x (B), where the scale bars represent 2 and 5 µm, respectively.

6 RAZPRAVA IN SKLEPI

6.2 RAZPRAVA

6.2.1 Amonij-oksidirajoče arheje in bakterije v obalnih vodah Tržaškega zaliva –letna dinamika

Zaradi vse večjega antropogenega vpliva na globalno kroženje dušika se soočamo s številnimi problemi, kot so zmanjšanje biodiverzitete, povečana produkcija toplogrednega plina N_2O in evtrofikacija kopenskih in morskih vodnih ekosistemov (Gruber in Galloway, 2008). Vplivu so še posebej podvržena polzaprti in plitva obalna območja s številnimi pritoki rek, kot je Tržaški zaliv. Povečani rečni vnosi raztopljenega anorganskega dušika (DIN) ter ortofosfata PO_4^{3-} , v obdobju pogostejših padavin v Tržaškem zalivu povzročijo nenadni razcvet fitoplanktona, s čemer se poveča količina partikulatne (POM) in raztopljene (DOM) organske snovi v sistemu (Malej in sod., 1995; Turk in sod., 2007; Mozetič in sod., 2012). Za sklenitev dušikove zanke, ki jo s kemijsko fiksacijo N_2 pospešuje človek so ključnega pomena oksidatorji amonija, ki ob heterotrofni razgradnji organske snovi sproščeni amonij- oksidirajo do NO_2^- . Nitrit po oksidaciji do NO_3^- vstopa v proces denitrifikacije pri kateri nastaja atmosferski dušik (N_2), ki se vrača v atmosfero.

Na podlagi razširjenosti nedavno odkritih amonij-oksidirajočih mezofilnih arhej debela *Thaumarchaeota*, ocenjujejo da so AOA poglavitni oksidatorji amonija v morskih, sladkovodnih in talnih ekosistemih (Wuchter in sod., 2006). Kakšna je razširjenost in sestava združbe oksidatorjev amonija v Tržaškem zalivu še ni znano. Tudi sicer ni znano kateri okoljski dejavniki najbolj vplivajo na njihovo dinamiko v morskih okoljih. Tržaški zaliv, ki ima zaradi svoje zaprtosti, plitkosti (manj kot 30 m globine) in številnih dotokov sladke vode specifične oceanografske značilnosti, predstavlja idealni ekosistem za študije vpliva različnih fizikalnih in kemijskih dejavnikov na razširjenost in sestavo različnih mikrobnih združb. Sezonska nihanja temperature, slanosti in nutrientov so v tem delu Jadrana namreč zelo izrazita in posredno ter neposredno vplivajo na mikrobne združbe v sistemu (Tinta in sod., v recenziji).

Rezultati kvantifikacije arhejskih in betaproteobakterijskih genov *amoA* v Tržaškem zalivu so pokazali, da so AOA tekom celega leta za 2 do 3 velikostne razrede bolj razširjene kot β AOB, kar je v skladu z rezultati mnogih študij, tako iz odprtih kot tudi obalnih morij (Wuchter in sod., 2006; Francis in sod., 2007; Mincer in sod., 2007; Agogue in sod., 2008; Beman in sod., 2008; Beman in sod., 2010; Newell in sod., 2013). Prevlada AOA potrjuje, da so le te dobro prilagojene na življenje v obalnem morju Tržaškega zaliva ter po vsej verjetnosti predstavljajo najpomembnejše oksidatorje amonija v tem okolju. Kljub številčni razliki, pa so koncentracije arhejskih in betaproteobakterijskih genov *amoA* tekom leta sovpadale, kar daje slutiti da na razširjenost obeh skupin vplivajo isti okoljski dejavniki. S primerjavo časovne dinamike AOA in β AOB z dinamiko okoljskih dejavnikov tekom enega leta, nam ni uspelo povsem razjasniti kateri izmed okoljskih faktorjev najbolj vpliva na takšno časovno razporeditev. Najvišje koncentracije arhejskih in betaproteobakterijskih genov *amoA* so bile izmerjene v hladnejših mesecih ter v pridnenem sloju in časovno niso sovpadale oziroma so negativno korelirale s koncentracijami substrata - NH_4^+ , ki so višek dosegle v poletnih mesecih (julij, avgust). Kot statistično značilne smo zaznali le povezave med številom AO in izmerjenimi koncentracijami nitrita in nitrata, ne pa tudi z ostalimi okoljskimi dejavniki.

Na podlagi vse večjega števila raziskav fiziologije, genetike in biokemije AOA, ki se vrstijo od njihovega odkritja leta 2005, se je razvilo kar nekaj hipotez, ki bi lahko pojasnile mehanizme ki zagotavljajo ekološko prednost AOA pred AOB. Ena od zelo pomembnih prednosti AOA bi lahko bila zelo visoka afiniteta za prevzem NH_4^+ ($K_m=0,142 \mu\text{M NH}_4^+$), ki je bila izmerjena v čisti kulturi arheje *N. maritimus*, saj je ta več kot 200-krat višja od afinitete izmerjene v bakterijskih kulturah; *N. europaea* ($K_m= 553 \mu\text{M NH}_4^+$), *N. oceanii* ($K_m=101,4 \mu\text{M NH}_4^+$) (Martens-Habbena in sod., 2009). Najnižja koncentracija NH_4^+ , potrebna za rast arheje *N. maritimus* pa znaša $\sim 10 \text{ nM}$, kar je >100 -krat manj od minimalne koncentracije potrebne za rast AOB ($>1 \mu\text{M}$) (Martens-Habbena in sod., 2009). S tako veliko afiniteto do skupnega substrata predstavljajo AOA v boju z AOB za prosti NH_4^+ močnega tekmeca predvsem v odprtih, pa tudi v obalnih morjih, kjer so povprečne koncentracije NH_4^+ precej nizke ($< 0,03 - 3 \mu\text{mol/l}$) (Bange, 2009). Čeprav je najvišja tekom naše študije izmerjena koncentracija NH_4^+ ($3,5 \mu\text{mol/l}$) zelo visoka v primerjavi s koncentracijami NH_4^+ v oceanih ($0,01 - 0,5 \mu\text{mol/l}$), je ta še vedno precej nižja od

koncentracije ki jo za optimalno hitrost rasti potrebuje β AOB *N. europaea*. (> 100 $\mu\text{mol/l}$) (Bollmann in sod., 2002).

Zelo verjetno je za številčno prevlado AOA v oligotrofnih morskih okoljih odgovoren tudi povsem drugačen metabolizem pridobivanja energije, ki so ga na podlagi genomskih analiz odkrili pri AOA (Walker in sod., 2010). Mehanizem oksidacije NH_4^+ in pretoka elektronov po dihalni verigi pri AOA še ni povsem pojasnjen. Najnovejše raziskave pa so potrdile, da je tako kot pri AOB tudi pri AOA, NH_2OH vmesni produkt pri oksidaciji amonija. Tekom iste raziskave se je izkazalo tudi, da je izkupiček energije pri arheji *N. maritimus* pri oksidaciji ene molekule NH_2OH višji, kot pri AOB (Vajrala in sod., 2013). Večji energijski izkupiček bi bil lahko znak, da oksidacija amonija pri AOA poteka po predlagani metabolni poti 2 (Slika 2.6), kjer se na dihalno verigo prenesejo vsi $4e^-$, ki nastanejo ob oksidaciji NH_2OH , medtem ko se v primeru AOB $2e^-$ vrnete na AMO za aktivacijo NH_4^+ (Stahl in De la Torre, 2012). Poleg uporabe morebitne metabolne poti, ki bi lahko bila vzrok za večji izkupiček energije pri enaki količini oksidirane substrata, pa bi lahko ekološko uspešnost AOA pripisali tudi sami biokemijski sestavi metabolnih proteinov, ki v nasprotju z z železom bogatimi proteini amonij-oksidirajočih bakterij, v svojih aktivnih centrih vsebujejo baker. Raztopljen baker je namreč v morski vodi običajno za en velikostni razred bolj razširjen kot železo (Urakawa in sod., 2011). Ekološko prednost pa predstavlja tudi »majhnost« celic AOA (10,2 fg proteinov/celico) v primerjavi z AOB (120 and 650 fg proteinov /celico), saj je zaradi ugodnejšega razmerja med maso in volumnom celice učinkovitost absorpcije za rast potrebnih elementov večja.

Čeprav so podobno kot v naši študiji, časovno in prostorsko sovpadanje arhejskih in betaproteobakterijskih AO pokazale tudi raziskave v nekaterih odprtih (Wuchter in sod., 2006) in obalnih morij (Beman in sod., 2010), so nekatere študije razporejenosti AO vzdolž slanostnega gradienta v estuarijih pokazale ravno nasprotno razporeditev. Kar pomeni, da v določenih okoljih na porazdelitev AOA in β AOB vplivajo različni okoljski dejavniki.

Kljub veliko večji afiniteti za prevzem NH_4^+ pa je maksimalna hitrost oksidacije amonija glede na celično biomaso v čisti kulturi arheje *N. maritimus* približno enaka (51,9 $\mu\text{mol NH}_4^+ / \text{mg proteinov/h}$) kot v primeru bakterije *N. europaea* (30 to 80 $\mu\text{mol NH}_4^+ / \text{mg}$

proteinov/h), kar bi v primerih, ko so koncentracije NH_4^+ v okolju dovolj visoke in prednost AOA pri prevzemu NH_4^+ ni več tako pomembna, pomenilo, da sta si skupini bolj enakovredni. Taki pogoji so prisotni v akvarijih z morskó vodo, kjer je razmerje med AOA in AOB bolj izenačeno (Urakawa in sod., 2008) ter v nekaterih z NH_4^+ obogatenih okoljih, kot je na primer estuarij San Francisco Bay (NH_4^+ : 1,7 - 15 $\mu\text{mol/l}$) (Mosier in Francis, 2008). Raziskovalci so v tem sistemu pokazali, da slanost bistveno vpliva na sestavo združbe AO, saj se je izkazalo, da AOB prevladujejo v predelih estuarja z visoko slanostjo (10-31 PSU), medtem ko so AOA prevladovale v predelih nizke slanosti (0,2 -0,9 PSU). Povprečna slanost v Tržaškem zalivu je precej višja ~ 37 PSU, razpon slanosti tekom leta pa precej manjši (30 – 38 PSU), kar je morda razlog, da statistično značilne korelacije med βAOB oziroma AOA in slanostjo v našem primeru nismo zaznali (Preglednica 5.1). Slanost je v Tržaškem zalivu povezana s pritoki rek ter temperaturno razslojenostjo vodnega stolpa v poletnem času, ko se voda nižje slanosti zadržuje na površini (Slika 5.1 in Slika 5.2). Morebitno korelacijo med AO in slanostjo bi tako lahko zaznali meseca julija, ko je bila vertikalna slanostna razslojenost največja (31,4 PSU -v površinskem sloju; 36,7 PSU v pridnenem sloju), vendar statistično značilne korelacije tudi v tem primeru nismo zaznali. Iz tega sklepamo, da je slanost pomemben dejavnik pri oblikovanju združbe AO le v tistih morskih okoljih, kjer je koncentracija NH_4^+ dovolj visoka, da lahko AOB uspešno tekmujejo z AOA.

Izkoriščanje določenih organskih substratov za namen pridobivanja energije, bi ravno tako lahko predstavljalo ekološko prednost AOA pred AOB. Geni, ki kodirajo transporterje za prevzem nekaterih organskih substratov, kot so aminokisline, oligopeptidi, glicerol in sulfonati, so bili namreč najdeni v genomu arheje *N. maritimus* in arheje *C. symbiosum* (Wahman in sod., 2009; Walker in sod., 2010). Eksperimentalno vpletenost teh molekul v energijski metabolizem v čistih in obogatenih kulturah AOA še ni bila potrjena (Hatzepichler, 2012). V kolikor pa je NH_4^+ edini vir energije za AO, bi pričakovali, da bodo AOA in βAOB najbolj razširjeni v obdobju najvišjih koncentracij NH_4^+ , vendar smo tekom naše raziskave izmerili najvišje koncentracija genov *amoA* v obdobju od oktobra 2010 do decembra 2010, ko so bile koncentracije NH_4^+ nizke (0,19 – 0,5 $\mu\text{mol/l}$) oziroma rahlo povišane (1,2 $\mu\text{mol/l}$) le v pridnenem sloju, medtem ko smo najvišje koncentracije NH_4^+ (1,8 - 3,6 $\mu\text{mol/l}$) v pridnenem sloju izmerili julija in v površinskem pa avgusta (0,89

– 1,78 $\mu\text{mol/l}$). Izmerjene višje koncentracije AO pri nižjih temperaturah in negativna korelacija števila genov *amoA* s koncentracijami NH_4^+ sovpadajo z rezultati predhodnih študij (Wuchter in sod., 2006; Herfort in sod., 2007; Mincer in sod., 2007; Beman in sod., 2008; Galand in sod., 2010; Lindas in Bernander, 2013). Za razlago tega pojava je ključen tudi podatek, da so koncentracije tako arhejskih kot tudi betaproteobakterijskih genov *amoA* v Tržaškem zalivu nekajkrat višje v pridnenem, kot v površinskem sloju v večini preučevanih časovnih točk. Vzrok za takšno prostorsko in časovno razporeditev bi lahko pripisali različnim svetlobnim pogojem, ki so jim pelagični mikroorganizmi izpostavljeni tekom leta ter v različnih globinskih slojih. Že dalj časa je znano, da so AOB občutljive na svetlobo, kar imenujemo fotoinhibicija. V skladu s teorijo o fotoinhibiciji je tudi razporeditev AOA in AOB v oceanih, saj so te najbolj razširjene v spodnjem delu evfotskega pasu (Mincer in sod., 2007; Beman in sod., 2008). Nedavno pa je bila fotoinhibicija potrjena tudi pri dveh različnih kulturah AOA (*N. maritimus* in *Nitrosotalea devanatera*), pri čemer se je pokazalo da je občutljivost na svetlobo pri AOA še bolj izrazita kot pri AOB (Merbt in sod., 2012). Zmanjšan vpadni kot sončnih žarkov (intenziteta in valovna dolžina) in krajši časi radiacije (krajši dan, manj sončnih dni), bi tako lahko pozitivno vplivali na rast AO, kar bi pojasnilo višje koncentracije AOA in β AOB v pridnem sloju Tržaškega zaliva, kjer je intenziteta svetlobe najmanjša ter viške razširjenosti AO novembra in decembra, ko je vpadni kot sončnih žarkov najnižji ter dolžina dneva najkrajša. Poleg tega pa bi lahko takšno razporeditev AO pojasnili tudi z večjo dostopnostjo hranil oziroma določenih mikronutrientov, katerih koncentracije so višje v pridnenem sloju oziroma v zimskem obdobju, zaradi resuspenzije sedimenta ob intenzivnem mešanju vodnega stolpa v jesenskem obdobju.

Na razporeditev AOA tekom leta bi lahko vplivala tudi dinamika pojavljanja posameznih vrst fitoplanktona. Nekatere študije arhejskih združb iz Severnega morja (Wuchter in sod., 2006; Herfort in sod., 2007) ter Kanala Santa Barbara (Murray in sod., 1999) poročajo o negativni korelaciji med prostorsko ali časovno povišanimi koncentracijami klorofila in številčnost arhejskih celic iz skupine MGI. Herfort in sodelavci (2007) so opazili tudi nižje koncentracije arhej v območjih Severnega morja, kjer so prevladovale večje fitoplanktonske vrste ($\sim 5 \mu\text{m}$) in višje koncentracije arhej tam kjer so prevladovale pikofitoplanktonske vrste (cianobakterije in fitoplanktonske vrste velikosti $< 3 \mu\text{m}$). V

našem primeru to lahko le delno potrdimo, saj se je koncentracija arhejskega gena *amoA* v površinskem sloju začela zviševati novembra - v obdobju razcveta večjih fitoplanktonskih vrst - diatomej ter dosegla najvišjo točko ob razpadu fitoplanktonskega razcveta – decembra, ko so vrednosti klorofila padle iz 2,9 do 0,38 $\mu\text{l/l}$ (Tinta in sod., v recenziji). Čeprav se naši rezultati ne ujemajo popolnoma z rezultati iz drugih območij, predvidevamo, da se AOA in predstavniki večjih fitoplanktonskih vrst potegujejo za NH_4^+ oziroma za nek drug substrat, ki ga v pozno jesenskem času v Tržaški zaliv vnesejo pritoki rek. Za boljše razumevanje morebitnih medsebojnih vplivov med glavnimi mikrobnimi skupinami, bi bile potrebne nadaljnje usmerjene raziskave njihove sezonske in prostorske dinamike.

V skladu z rezultati mnogih študij je tudi pozitivna korelacija med AOA in koncentracijo nitrita (NO_2^-) ter koncentracijo nitrata (NO_3^-) v pridnenem sloju. Ta korelacija ni presenetljiva saj NO_2^- in NO_3^- nastajata v procesu nitrifikacije ter nakazujeta na povečano nitrifikacijsko aktivnost. To še posebej velja za nitrit, ki je vmesni produkt v procesu nitrifikacije in se zaradi hitrega delovanja nitritnih-reducentov v okolju ne kopiči. Pozitivno korelacijo med NO_3^- in AOA, ki je v odprtih morjih pogosta, v Tržaškem zalivu zaznamo le v pridnenem sloju, kjer je vpliv sladkovodnih pritokov manjši. V nasprotju z odprtimi morji, kjer lahko opazimo statistično značilno povezavo med AOA in NO_3^- (Beman in sod., 2008), so namreč v obalnih morjih, kot je Tržaški zaliv, poleg nitrifikacije pomemben vir NO_3^- vnosi rek.

Poletna temperaturna in gostotna razslojenost vodnega stolpca je zaradi plitkosti bazena zelo značilen pojav v Tržaškem zalivu (Malačič in Petelin, 2001). Njeno stabilnost v poletnem času še dodatno povečuje krožni tok vodnih mas, ki se ustvari znotraj zaliva in le tega izolira od ostalih južno-Jadranskih vodnih mas (Supić in Orlić, 1999). Odsotnost vertikalnega mešanja morske vode med gostotnimi sloji močno vpliva tako na vertikalno razporeditev nutrientov kot tudi na razporeditev AO (Slika 5.3). Vertikalna razporeditev arhejskih in betaproteobakterijskih genov *amoA* sta povezani in razen v pridnenem sloju dobro sovpadata s koncentracijo NH_4^+ , česar pri časovni razporeditvi genov nismo zaznali. Še posebej zanimiva je globinska pojavnost betaproteobakterijskih genov *amoA*, ki smo jih zaznali le v slojih, kjer je bila izmerjena koncentracija NH_4^+ višja ali enaka 1 $\mu\text{mol/l}$, kar je

tudi najnižja koncentracija ki še dovoljuje rast AOB v čistih kulturah (Martens-Habbena in sod., 2009). Iz globinske razporeditve nutrientov je dobro vidna tudi povezava med povišano koncentracijo NO_3^- in nizko slanostjo (30,5 – 31,5 PSU), ki se kopičita v površinskem sloju (Slika 5.3). Ravno nasprotna pa so meseca februarja, ko razslojenost ni prisotna, koncentracije hranil in genov *amoA* homogeno razporejene vzdolž vodnega stolpa (Slika 5.4). Kar razločno kaže na vpliv temperaturne in gostotne razslojenosti vodnega stolpa na vertikalno razporeditev AOA in β AOB.

V nekaterih morskih okoljih, so poleg betaproteobakterijskih AO zaznali prisotni AO iz rodu *Nitrosococcus*, ki se uvrščajo med gamaproteobakterije (Ward in O'Mullan, 2002; Lam in sod., 2007). Njihova razširjenost in ekologija je slabo poznana, poleg tega raziskovalci poročajo o neuspešnem pomnoževanju značilnega zaporedja gena *amoA* za ta rod, oziroma v koncentracijah, ki so pod mejo detekcije (Wuchter in sod., 2006; Beman in sod., 2008). Pomnoževanje teh genov je bilo neuspešno tudi v našem primeru, zato sklepamo da gamaproteobakterijski AOB v Tržaškem zalivu niso prisotne oziroma je njihova koncentracija pod mejo detekcije metode PCR in zato bistveno ne pripomorejo k oksidaciji NH_4^+ .

6.2.1.1 Filogenetska raznolikost združbe amonij- oksidirajočih arhej v Tržaškem zalivu

Zaradi visoke številčne prevlade arhejskih genov *amoA* nad betaproteobakterijskimi, ki smo jo zaznali tekom celega leta, sklepamo, da so amonij-oksidirajoče arheje glavni vršilci procesa oksidacije NH_4^+ v Tržaškem zalivu. Prisotnost AOA v visokih koncentracijah je bila ugotovljena v mnogih morskih ekosistemih, poleg tega pa je bila odkrita tudi velika globalna pestrost združbe AOA (Beman in sod., 2008). Na podlagi variabilnosti gena *amoA* se amonij-oksidirajoče arheje filogenetsko uvrščajo v pet glavnih klastrov in dalje v več podklastrov, ki so jih avtorji poimenovali glede na življenjski prostor v katerem so bili zaznani prvi predstavniki (Francis in sod., 2005). Takšna filogenetska razvrstitev je rezultat številnih študij, ki temeljijo predvsem na prostorski (geografsko, različne ekološke niše) raznolikosti gena *amoA*. Zelo malo pa je študij časovno - sezonskih sprememb združb AOA v posameznih okoljih. Da bi ugotovili ali se tekom leta, kot odziv na spreminjajoče

se razmere v Tržaškem zalivu spreminja tudi združba AOA ter dobili vpogled v njeno strukturo smo opravili filogenetsko analizo na podlagi variabilnosti arhejskega gena *amoA*.

DGGE analiza variabilnosti gena *amoA* je pokazala, da se združba AOA v Tržaškem zalivu ob prehodu iz toplejšega (april – september) v hladnejši dela leta (oktober – marec) spremeni. Združba ki prevladuje v toplejšem delu leta se razlikuje od tiste, ki se vzpostavi po premešanju vodnega stolpca na prehodu v hladnejši del leta, tako ločimo »toplejši« in »hladnejši« tip združbe (Slika 5.6). Razlike med združbama so vidne v neenakomerni razširjenosti posameznih genotipov tekom leta, kot tudi v prisotnosti oziroma odsotnosti določenih genotipov. Vzrok za nenadno spremembo združbe je najverjetneje premešanje vodnega stolpa v jesenskem času (september-oktober), do katerega pride ko se zaradi burje površinska voda umika iz zaliva in jo nadomesti voda globinskih vodnih mas, ki v zaliv vstopa iz juga (Malačič in sod., 2009). Burja lahko v le nekaj urah premeša celoten vodni stolpec, v nekaj dneh pa zamenja celotno vodno maso v Tržaškem zalivu. Močna burja, ki je bila v zalivu prisotna v dneh med 17. in 20. 9. 2010 (Tinta in sod., v recenziji) je tako najverjetnje vzrok za določene spremembe v sestavi združbe AOA, ki smo jih kmalu zatem (23. 9. 2010) zaznali na podlagi analize DGGE v obeh vzorčevanih slojih (Slika 5.5). Nekateri genotipi AOA lahko, kot posledica premešanja vodnega stolpa, izvirajo iz sedimenta ali pa so v zaliv prišli z globinskimi vodnimi masami iz juga. Nenazadnje pa obstaja možnost, da so ti genotipi v zelo majni koncentraciji prisotni v zalivu ves čas in se zaradi vnosa dodatnih hranil (pritoki rek, resuspenzija sedimenta, vnos z globljimi vodnimi masami) ter spremembe fizikalnih pogojev v jesenskem obdobju bolj namnožijo, kar opazimo kot spremembo združbe AOA. Tako lahko sklepamo, da so optimalni pogoji za rast različnih genotipov AOA različni in v določenih pogojih lahko dobro uspevajo samo nekateri genotipi. Večja pestrost oziroma prisotnost večih različnih genotipov, ki so prilagojeni na različne okoljske pogoje, združbi omogoča hiter odziv na spremembe v okolju ter zagotavlja neprekinjen potek procesa oksidacije NH_4^+ .

Na podlagi DGGE analize ocenjena pestrost združbe je nekoliko višja v hladnejšem delu leta, vendar pa se zopet zniža v mesecu novembru in decembru, to je v časovnih točkah ko je številčnost združbe AOA največja (Preglednica 5.3). Izkaže se, da je za visoke koncentracije arhejskih *amoA* genov v zimskem obdobju odgovoren en sam genotip AOA

(Slika 5.7), kar pripisujemo najboljši prilagojenosti tega genotipa na trenutne razmere v okolju.

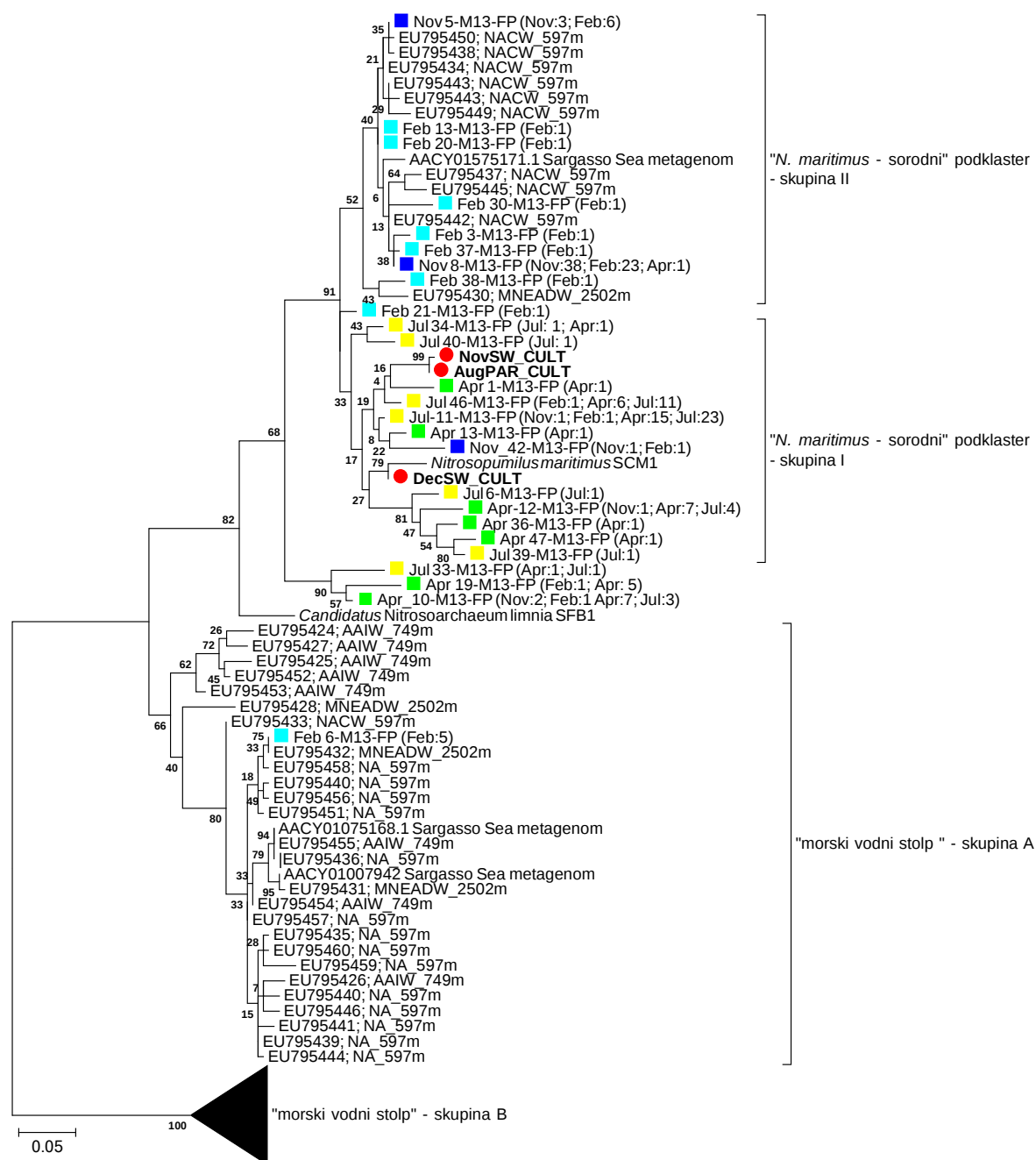
Kljub temu, da skupna analiza rezultatov iz površinskega in pridnenega sloja zaradi različnih hitrosti potovanja DGGE fragmentov v dveh ločenih gelih ni bila mogoča, lahko s pomočjo vizualne primerjave gelov ugotovimo, da se združbe v površinskem in pridnenem sloju v isti časovni točki bistveno ne razlikujejo (Slika 5.5). Nekaj razlik opazimo le v toplejšem delu leta, vendar le v številčnosti nekaterih genotipov ter v splošno nekoliko večji pestrosti združbe v pridnenem sloju, kar bi lahko pripisali razslojenosti vodnega stolpa in resuspenziji sedimenta pri čemer v vodo nad dnom prehajajo tudi genotipi AOA značilni za sedimente. To nakazuje, da poletna razslojenost vodnega stolpca vpliva tudi na samo sestavo združbe AOA. Kljub temu pa smo ocenili, da je sezonska variabilnost združbe večja kot variabilnost med globinskimi sloji, čeprav bi bilo za potrditev sezone periodičnosti pojavljanja posameznih genotipov in natančnejše določanje njihove ekološke vloge v Tržaškem zalivu, potrebno opraviti dodatne analize v daljšem časovnem obdobju.

Sezonskost združbe AOA smo potrdili tudi z analizo sekvenc gena *amoA*, ki smo jih pridobili z izdelavo genskih knjižnic iz sezonskih vzorcev na globini 21 m. Filogenetska analiza je pokazala, da se vse analizirane amonij-oksidirajoče arheje iz Tržaškega zaliva uvrščajo v klaster *Nitrosopumilus*, kamor se uvršča tudi večina AOA iz morskih okolij. Večina sekvenc gena *amoA* je bila uvrščena v podklaster »*N. maritimus*-sorodni« podklaster, znotraj katerega so tvorile dve ločeni skupini glede na čas vzorčenja. V prvo skupino so se skupaj z *N. maritimus* uvrstile predvsem AOA iz spomladanskega (april) in poletnega (julij) vzorca morske vode (Slika 6.1). Njihova podobnost z *N. maritimus* znaša od 91 do 96 %. Uvrstitev teh sekvenc skupaj z *N. maritimus* ni presenetljiva saj so verjetno genotipi, ki se pojavljajo v toplejšem delu leta, tako kot *N. maritimus* prilagojeni na višjo temperaturo (25 -30 °C) in zmerno povišane koncentracije NH_4^+ (1,5 -3 μM). Večina AOA iz vzorcev odvzetih v jesenskem (november) in zimskem (februar) času pa se uvršča v drugo skupino. Njihova podobnost z *N. maritimus* na nivoju gena *amoA* znaša od 88 do 92 %. To skupino bi lahko glede na poimenovanje skupin AOA po Beman in sodelavci (2008) (Slika 2.5) poimenovali tudi »sedimentno/koralna« skupina, kar bi lahko razložili s prisotnostjo »sedimentnih« genotipov AOA po celotnem vodnem stolpu, zaradi

intenzivnejšega mešanja morske vode v hladnejšem – hidrološko bolj dinamičnem obdobju. Vendar pa moramo biti pri takem sklepanju previdni, saj se je pokazalo, da se v filogenetske skupine, ki so bile imenovane glede na okolje v katerem so bili najdeni prvi predstavniki, kasneje uvrščajo tudi sekvence, ki so bile izolirane iz drugih okolij ter da filogenetska uvrstitev ni vedno vezana na izvor posameznega predstavnika združbe (Pester in sod., 2012). Tako se v omenjeno skupino uvrščajo tudi AOA iz mezopelagičnega sloja Severnega Atlantskega oceana (globina ~600 m; 49,73 °N), ki ne izhajajo iz sedimenta (Agogue in sod., 2008).

Poleg omenjene večine sekvenc, so se nekatere OTU, ki združujejo predvsem sekvence gena *amoA* iz aprilskega ter julijskega vzorca pojavile kot ločena podskupina z manjšo podobnostjo glede na arhejo *N. maritimus* (Slika 6.1).

Predvidevanje, da so v vodnem stolpcu Tržaškega zaliva prisotne predvsem AOA, ki sodijo v podklaster »morski vodni stolp« - v »plitvo-morsko« skupino (skupina A), se ni izkazalo za pravilno, saj se je v to skupino zagotovo uvrstila le ena OTU, ki združuje pet sekvenc gena *amoA* iz februarskega vzorca (Slika 6.1). Vendar se je izkazalo, da je delitev AOA na »plitvo-morsko« in »globoko-morsko« skupino zelo ohlapna in da gre v bistvu za AOA, ki so prilagojene na različne koncentracije NH_4^+ (HAC; povprečno 1,24 μM ; LAC: < 0,01 μM NH_4^+) (Francis in sod., 2005; Sintes in sod., 2013). Razlika v zaporedju gena *amoA*, ki ločuje ekotip HAC od ekotipa LAC verjetno prispeva k različni afiniteti encima AMO do amonija. Analiza sekvenc gena *amoA* iz naših genskih knjižnic je pokazala, da bi večino sekvenc gena *amoA* iz Tržaškega zaliva lahko uspešno pomnožili z začetnimi oligonukleotidi, ki so jih Sintes in sodelavci (2013) razvili za pomnoževanje *amoA* arhej, ki se značilno pojavljajo v območju z višjo koncentracijo NH_4^+ , kar pomeni da v Tržaškem zalivu prevladuje AOA ekotip HAC. Takšna opredelitev se sklada tudi z definicijo ekotipa HAC, saj so bile izmerjene koncentracije NH_4^+ v času vzorčenja višje od 0,05 μM , v povprečju pa 1,09 μM v pridnenem in 0,47 μM v površinskem sloju. Tako sklepamo, da uvrstitev večine AOA izven podklastra »vodni stolp«, ni pogojena z afiniteto encima AMO do substrata ampak z drugimi parametri, ki jih tekom študije nismo uspeli določiti.



Slika 6.1: Skupno filogenetsko drevo vseh sekvenc arhejskega gena *amoA* pridobljenih tekom celotne raziskave.

Drevo je izdelano po metodi največje podobnosti (Maximum likelihood) z upoštevanjem 2-parameterskega Kimura modela nukleotidnih zamenjav, verjetnost posameznih povezav je testirana z metodo Bootstrap z 200 ponovitvami. Zaporedja *amoA* iz okoljskih vzorcev so združena v enote OTU na podlagi 98 % podobnosti. Posamezne OTU so označene glede na mesec iz katerega izhaja največje število sekvenc: november (temno modra), februar (svetlo modra), april (zelena), julij (rumena). Število sekvenc v posamezni OTU in njihov izvor so podani v oklepaju poleg imena OTU. Z rdečim krogom so označene sekvence gena *amoA* iz obogatenih kultur. Referenčne sekvence gena *amoA* so bile povzete po Agogue in sod. (2008) .

Figure 6.1: Phylogenetic tree of all *amoA* gene sequences obtained during this study.

Tree was constructed using Maximum likelihood construction method based on 2-parameter Kimura substitution model, the probability was tested with bootstrap analyses. The OTUs comprising *amoA* genes from different season based on 98 % similarity are marked according to month of sampling of majority of the sequences: November (dark blue), February (light blue), April (green), July (yellow). Number and source of the sequences in each OTU is given in brackets next to the OTU name. *AmoA* gene sequences obtained from enrichment cultures of *Thaumarchaeota* are marked with red circle. Reference *amoA* genes' sequences were adopted from Agogue et al. (2008) .

Razmerje med številom arhejskih genov *amoA* in genov 16S rRNA skupine *Thaumarchaeota* MGI je ravno tako pokazalo na sezonsko razdeljenost združbe AOA. Delež je zelo visok v površinskem sloju v toplejših delih leta in bi lahko pomenil prisotnost vrst z velikim številom kopij genov *amoA* na genom. Medtem, ko je delež v hladnejših mesec nižji (med 1,3 in 1,8) v obeh slojih. V pridnenem sloju je v toplejših delih leta razmerje AOA *amoA* /MGI 16S rRNA znašalo < 1 , kar bi lahko pomenilo prisotnost vrst MGI, ki ne vsebujejo gena *amoA*. Nenavadno visoko razmerje *amoA*:MGI v toplejšem delu leta, bi lahko bilo tudi posledica inhibicij pri pomnoževanju gena 16S rRNA, zaradi prisotnosti neznanih inhibitornih snovi v vodnem stolpu v tem delu leta, vendar je bila inhibicija tekom analize izključena. Čeprav so nekateri avtorji ravno tako poročali o razmerju > 10 (Church in sod., 2010), so drugi kasneje pokazali, da je delež MGI genov podcenjen zaradi nepopolnega naleganja začetnih oligonukleotidov pri pomnoževanju genov v vzorcih iz antarktičnega morja (Alonso-Sáez in sod., 2012). Kar bi bil lahko razlog tudi za visoko razmerje genov v primeru poletne združbe AOA v Tržaškem zalivu.

6.2.2 Pestrost arhejske in bakterijske združbe v morskem snegu in večjih organskih agregatih

Pojav morskega snega in večjih organskih agregatov je v Tržaškem zalivu zelo pogost, ti občasno dosežejo velikosti tudi po več metrov v dolžino, kar je fenomen ki je omejen na nekatera polzaprtá območja Mediteranskega in Jadranskega morja (pregled v Turk in sod., (2007)). V Tržaškem zalivu se večji organski agregati pojavljajo predvsem pozno spomladi in poleti, ko se zaradi intenzivnega razcveta fitoplanktona v vodnem stolpu močno poveča količina raztopljené organske snovi. Ta se ob stabilnih hidroloških pogojih, ko je vodni stolpec temperaturno in gostotno razslojen, združuje v vse večje strukture, kar privede do nastanka morskega snega in večjih agregatov (Turk in sod., 2007; Turk in sod., 2010). Organski agregati kot tudi manjši delci morskega snega, predstavljajo z organsko snovjo obogatena mikrookolja, kjer se zaradi pospešene heterotrofne razgradnje aktivno porablja kisik, kar vodi do nastanka suboksičnih mikrookolij (Wright in sod., 2012). Poleg tega pa je zaradi poteka amonifikacije koncentracija NH_4^+ v agregatih ter njihovi neposredni bližini večja kot v okolici in nekateri avtorji poročajo, da so delci morskega snega tudi mesta kjer poteka nitrifikacija (Karl in sod., 1984); (Coolen in sod., 2007). Znano je, da tekom bakterijske oksidacije amonija v suboksičnih okoljih kot stranski produkt nastaja toplogredni plin N_2O , ki je zaradi svoje dolge življenjske dobe v atmosferi, kar 310-krat bolj potenten toplogredni plin kot CO_2 in je odgovoren za 5-7 % celotnega toplogrednega efekta (Frame in Casciotti, 2010; Braker in Conrad, 2011). Nedavno so raziskovalci opisali visoko produkcijo N_2O v čisti kulturi arheje *N. maritimus* pri koncentraciji kisika pod 35 $\mu\text{mol/l}$ ter tako nakazali, da so verjetno AOA, ko so izpostavljene nizkim koncentracijam kisika. glavni producent N_2O v oceanih (Loescher in sod., 2012).

Zaradi suboksičnih razmer znotraj agregatov, še posebej v času obsežnejših pojavov makroagregatov v Tržaškem zalivu, bi lahko ob prisotnosti AOA ti predstavljali pomemben izvor emisij N_2O . Zato smo želeli raziskati kakšna je gostota in pestrost združbe AO na večjih in manjših organskih agregatih, ki se tekom leta pojavljajo v Tržaškem zalivu. Poleg tega je sestava bakterijskih združb, ki naseljujejo morski sneg in večje organske agregate v severnem Jadranu slabo raziskana, zato smo preverili tudi sestavo bakterijske združbe in preverili ali se ta v različnih letnih časih, ko se v stolpcu

prisotni agregati različnih izvorov, zaradi specifičnih fizikalno – kemijskih značilnosti agregata razlikuje od prostoživeče.

Na morskih agregatih smo z mikroskopsko analizo po označevanju celic z metodo CARD-FISH, zaznali prisotnost predstavnikov treh glavnih prokariotskih debel: *Crenarchaeota* (sonda označuje tudi *Thaumarchaeota*), *Euryarchaeota* in *Bacteria*. Pri tem je bil delež arhejskih skupin večji na agregatih in morskem snegu kot v okolni vodi, predvsem na račun *Euryarchaeota*. Zanimivo se relativni delež *Euryarchaeota* kot tudi delež *Crenarchaeota* v morskem snegu povečuje od hladnejših proti toplejšim mesecem ter ob koncu poletja strmo pade, medtem ko je trend pojavljanja v okolni vodi ravno obraten. Podrobnejša filogenetska analiza arhejske združbe na podlagi raznolikosti 16S rRNA genov je v vzorcu decembrskega morskega snega in okolne vode pokazala prevlado arhejske OTU, ki se uvršča v deblo *Thaumarchaeota*, in je filogenetsko blizu arheji *N. maritimus* ter arheji *Nitrosopumilus Koreensis*, zato sklepamo, da OTU predstavlja združbo oksidatorjev NH_4^+ , ki smo jih na podlagi gena *amoA* v prvem delu študije zaznali v morski vodi (glej poglavje 5.2.4.2). Isto OTU smo zaznali tudi v okolni vodi avgusta, kjer je bila arhejska pestrost zelo nizka in je omenjena OTU povsem prevladala (Slika 5.12). Medtem ko arhejske združbe vezane na večje organske agregate žal nismo uspeli analizirati zaradi neuspeha pri pomnoževanju genov 16S rRNA.

Poleg omenjene prevladujoče OTU smo v decembrskem morskem snegu, zaznali tudi druge arheje iz debela *Thaumarchaeota*, ki se uvrščajo v skupino talnih in sedimentnih arhej v kateri najdemo tudi talno amonij-oksidirajočo arhejo *Nitrososphaera vienennsis*. Zato predvidevamo, da nekatere arheje ali celo sami makroskopski delci, ki smo jih zajeli v vzorec morskega snega izvirajo iz sedimenta, zaradi večje preturbacije vodnega stolpca v tem obdobju.

Analiza bakterijske združbe prisotne na delcih morskega snega in agregatov ter bakterijske združbe v okolni morski vodi v različnih letnih časih je pokazala, da je pestrost bakterijske združbe mnogo večja od pestrosti arhejske združbe. Pestrost je bila razen v drugi polovici avgusta, v vseh letnih časih višja v okolni vodi kot na agregatu, kar je lahko posledica hitre namnožitve določenih bakterijskih vrst, ki so prilagojene na razgradnjo kompleksnih oligo-

in polimerov iz katerih je sestavljen matriks agregatov. V velikih organskih agregatih, ki so se pojavili v drugi polovici avgusta, je bila pestrost bakterijske združbe večja oziroma enaka kot v okolni vodi, kar pripisujemo dejstvu da so to agregati, ki so zaradi svoje nerazgradljivosti v vodnem stolpcu prisotni že nekaj časa. V procesu »staranja« takšnega agregata se je spreminjala tudi bakterijska združba, povišana pestrost bi tako lahko pomenila, da so v agregatu prisotne različne bakterijske vrste, ki so po svojem aktivnem obdobju ostale vezane na agregat.

Analiza T-RFLP je pokazala, da je sestava združbe bolj odvisna od samega letnega časa v katerem je bila vzorčena, kot pa od okoljske niše, ki jo naseljuje (morski sneg/ vodni stolpec). To potrjuje, da je nabor okoljskih dejavnikov, ki v nekem trenutku prevladujejo v vodnem stolpcu zelo pomemben pri oblikovanju prostoživeče bakterijske združbe kot tudi združbe na morskih agregatih. Takšen odnos smo zaznali tudi v decembrskem vzorcu, kot tudi v vzorcih poleti, medtem ko so se bakterijske združbe vezane na spomladanske agregate bolj razlikovale od združb v okolni vodi. Kar pripisujemo dejstvu, da so v spomladanskem obdobje značilne hitre spremembe okoljskih dejavnikov zaradi spremenljivih vremenskih in hidroloških pogojev in s tem povezani biološki procesi (Mozetič in sod., 2012). Sklepamo lahko, da v času hitrih okoljskih sprememb agregati predstavljajo bolj stabilno okolje, ki pripomore k ohranjanju bakterijske sestave, medtem ko se bakterijska združba v okolni vodi hitro spreminja.

Podrobnejša filogenetska analiza vzorcev morskega snega in vode v mesecu decembru in avgustu je pokazala, da so najbolj razširjene bakterije iz razredov *Cyanobacteria*, *Alpha-in Gamma - Proteobacteria* ter *Bacteroidetes* (CFB), med vzorci morskega snega in vode pa njihov delež variira. Analiza združbe na nižjem taksonomskem nivoju – nivoju družin, je pokazala nekatere zanimive vzorce, na podlagi katerih lahko sklepamo na izvor in starost delcev morskega snega. Tako lahko glede na zaporedja 16S rRNA, ki se uvrščajo med cianobakterije sklepamo, da je decembrski morski sneg nastal iz eksopolimerov oziroma raztopljenih organske snovi, ki so se nakopičile tekom diatomejskega razcveta. Slednji je bil zaznan približno teden dni pred pojavom morskega snega (Tinta in sod., v recenziji). Glede na velik delež cianobakterij družine *Synechococcus* v avgustovskih agregatih in okolni

vodi lahko domnevamo, da te cianobakterije prispevajo pomemben delež organske snovi pri tvorbi samih agregatov, kot to predvidevajo Fuks in sodelavci (2005).

Velik delež bakterij iz družine *Vibrionaceae*, ki se pojavlja izključno v velikih agregatih avgusta, ter večja bakterijska pestrost vrst na agregatu kot v njegovi okolici, govori o tem da gre za starejše agregate, ki so zaradi stabilnih poletnih razmer v vodnem stolpcu prisotni dlje časa. Saj so tak vzorec opisali Danovaro in sodelavci (2009) v velikih sluznih agregatih iz severno-zahodnega Jadrana. V bakterijski združbi, ki je vezana na delce decembrskega morskega snega in okolno vodo se pojavljajo nekatere bakterijske skupine, ki so značilne za okolja z nizko slanostjo ter sladkovodna okolja (*Betaproteobacteria*, *Verucomicrobia* and *Actinobacteria*) in katerih izvor bi lahko bili večji pritoki sladke vode v pozno jesenskem času. Tako kot pri arhejski združbi pa se tudi tu pojavljajo skupine (*Gemmatimonadetes* in *Acidobacteria*), ki bi lahko izvirale iz resuspendiranega sedimenta.

Prisotnost anaerobnih in fakultativno anaerobnih bakterijskih in arhejskih skupin, kot so *Bacteroides*, arheje iz rodov *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* v delcih decembrskega morskega snega, ter prisotnost reducentov sulfata iz razreda gamaproteobakterij v avgustovskih agregatih, nakazuje na obstoj suboksičnih mikrookolij znotraj večjih organskih agregatov, kot tudi znotraj morskega snega.

Aktivne bakterijske združbe analizirane na podlagi prepisov gena 16S rRNA se od obstoječih združb razlikujejo. Razlika se kaže tako v odsotnosti nekaterih vrst na nivoju rRNA, kot tudi v prisotnosti določenih vrst, ki jih na 16S rDNA nivoju ne zaznamo. Predvidevamo lahko, da so nekatere bakterije v morski vodi zelo aktivne, vendar je njihovo število pod mejo detekcije metode in obratno, da se nekatere vrste bakterij pojavljajo v zelo velikem številu, vendar niso aktivne (Campbell in sod., 2011).

6.2.3 Izolacija amonij- oksidirajoče arheje

Da bi se prepričali, kakšne fiziološke in metabolne lastnosti so značilne za AOA v Tržaškem zalivu smo v obogateni kulturi izolirali amonij-oksidirajočo arhejo iz morske vode Tržaškega zaliva. Tako kot večina prisotnih AOA v tem območju, je tudi obogatena arhejska kultura kazala visoko podobnost s prvo v čisti kulturi izolirano arhejo *N. maritimus* (99 % na podlagi gena za 16S rRNA ter 94 -97 % na genu *amoA*). Morfološka analiza arheje v obogateni kulturi se je prav tako ujemala z morfologijo celic arheje *N. maritimus*. V primerih obeh izolatov v kulturi prevladujejo 1 µm dolge in 0,2 µm široke celice pravilne paličaste oblike. Skoraj stehiometrična pretvorba NH_4^+ kot edinega vira energije v kulturi, do NO_2^- , pa potrjuje, da gre za kemoautotrofne oksidatorje amonija. Zmožnost uporabe organskih snovi kot vir energije in ogljika v tem delu raziskave ni bila testirana, zato ne morem ovreči možnosti, da so obogatene kulture sposobne heterotrofnega oziroma miksotrofnega načina življenja. Določeni optimalni pogoji za rast obogatenih izolatov so podobni kot so jih določili tudi v primeru arheje *N. maritimus* ($T \sim 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} \sim 7,5$).

Ker sta bila vzorca morske vode iz katerih smo izolirali arhejska izolata, odvzeta meseca novembra in decembra, smo pričakovali, da se bosta izolata po fizioloških lastnostih razlikovala od že znane arheje *N. maritimus*, ki izvira iz sedimenta v tropskem akvariju, kjer je temperatura vode višja ($> 25^\circ\text{C}$). Vendar se je izkazalo, da je optimalna temperatura za rast izolata N25 $\sim 30^\circ\text{C}$ ter da se na podlagi gena *amoA* filogenetsko oba izolata uvrščata v isto skupino kot arheja *N. maritimus* in večina zaporedij gena *amoA* iz genskih knjižnic aprilskega in julijskega vzorca morske vode (skupina I) (Slika 6.1) in ne v skupino II, kamor se uvršča večina zaporedij iz genskih knjižnic novembrskega in februarkega vzorca. Čeprav N25 izvira iz morske vode odvzete v mesecu novembru, ne pripada prevladujoči enoti OTU, ki je odgovorna za visok porast arhejskih genov *amoA* v novembru. Presenetljivo nizka pa je optimalna pH vrednost za rast izolatov, ki znaša $\sim 7,5$, kar je nižje od običajne pH vrednosti morske vode ($\sim 8 - 8,3$). Pri pH 7,5 je tudi ravnovesje med NH_3 in NH_4^+ pomaknjeno, bolj v prid NH_4^+ kot pri okoljski pH vrednosti, zato je na voljo še manj NH_3 , ki pasivno prehaja skozi celično membrano in pri AOB predstavlja

substrat za encim AMO. Zato sklepamo, da imajo tudi AOA mehanizem, ki zaobide to omejitev oziroma njihov encim AMO, kot substrat uporablja NH_4^+ .

Tekom gojitvenega postopka se je izkazalo, da sama obogatitev arheji *N. maritimus* - sorodne arheje v gojišču SCM ni posebej zahtevna. Veliko zahtevnejši in dolgotrajen je postopek obogatitve do čistosti kulture in vzdrževanje takšne kulture, saj je zaradi občutljivosti na perturbacijo ne moremo gojiti v pretočnem kemostatu. Prav tako so bili poizkusi zamrzovanja celic N25 in V25 v glicerolni raztopini in ponovne oživitve neuspešni, zato je izolate potrebno gojiti v kontinuirani zaprti (ang. batch) kulturi.

Kljub temu, da sta obogatena arhejska izolata, bližja sorodnika že poznane arheje *N. maritimus*, sta pomembna za boljše poznavanje teh še nedolgo znanih organizmov. Na podlagi lastnosti obogatene AOA ter raznolikosti AOA v oceanih sklepamo, da so AOA vrste *N. maritimus*, najbolj primerne za gojenje v laboratorijskih kulturah, z metodami ki smo jih uporabili. Morske arheje iz nekaterih drugih filogenetskih podskupin, kot je na primer »globoko-morska« skupina, še nimajo v čisti ali visoko obogateni kulturi izoliranega predstavnika. Vendar je za izolacijo fiziološko različnih in filogenetsko bolj oddaljenih amonij-oksidirajočih arhej potrebna uporaba drugačnih – izpopolnjenih metod, katerih razvoj bo morda omogočila prav analiza genomov še nekultiviranih genotipov in tekom nje odkritih novih metabolnih poti, ter drugih biokemijskih značilnosti.

6.3 SKLEPI

- Najvišjo koncentracijo AOA in β AOB smo zaznali v zimskem obdobju ter v pridnenem sloju.
- AOA predstavljajo večinski del amonij-oksidirajoče združbe v Tržaškem zalivu.
- Temperaturna razslojenost vodnega stolpca v poletnem obdobju močno vpliva na razporeditev AO.
- S statistično analizo smo potrdili neposredno povezavo števila AO z izmerjenimi koncentracijami nitrita in nitrata, ne pa tudi z ostalimi okoljskimi dejavniki.
- Značilne so sezonske spremembe v sestavi združbe AOA: sestava združbe AOA se ob prehodu iz toplejšega dela leta v hladnejši del spremeni, kar je najverjetneje posledica popolnega premešanja vodnega stolpa.
- Na delcih morskega snega in okolni vodi prevladujejo AOA iz rodu *Nitrosopumilus*, medtem ko predstavnikov AOB v genskih knjižnicah bakterijskega 16S rRNA nismo zaznali.
- V bakterijski združbi v morski vodi, agregatih in morskem snegu prevladujejo bakterije iz skupin *Cyanobacteria*, *Alpha*- in *Gamma* – *Proteobacteria* in *Bacteroidetes*.
- Iz vzorca morske vode iz Tržaškega zaliva smo v obogateni kulturi (~98 %) pridobili dva izolata amonij- oksidirajoče arheje ter en izolat AOA iz morskega snega. Vsi izolati se filogenetsko uvrščajo v rod *Nitrosopumilus*, na podlagi analize gena *amoA* pa v klaster *Nitrosopumilus* in podklaster »*N. maritimus* – sorodnih« AOA - v skupino I, kamor se uvršča tudi večina AOA, ki so bile vzorčene v toplejšem delu leta, kljub temu da sta bila dva izmed treh izolatov pridobljena iz vzorca morske vode v zimskem času.
- Izmerjena optimalna temperatura za rast obogatene AOA je ~30 °C, optimalna pH vrednost pa med 7,2 in 7,5. V kulturi so prevladovali celic pravilnih paličastih oblik, dolge ~1 μ m in široke 0,2 μ m.
- Izolacija in gojenje AOA v obogateni kulturi je dolgotrajen proces, poleg tega pa je ohranjanje aksenične kulture zaradi kontaminacije z na antibiotik odpornimi bakterijami izredno zahtevno.

-

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.2 POVZETEK

Ob razgradnji organske snovi v morskih okoljih se sproščajo različne anorganske spojine med njimi tudi NH_4^+ (amonifikacija), ki ga v oksigenih plasteh vodnega stolpa oksidira nitrifikacijska prokariontska združba, pri čemer nastaja NO_3^- . Proces imenujemo nitrifikacija in je pomemben člen v globalnem kroženju enega najpomembnejših elementov – dušika. Prvo in limitativno stopnjo nitrifikacije predstavlja oksidacija amonija, ki jo v dveh korakih vršijo dve povsem različni skupini mikroorganizmov. Za prvi korak, v katerem se NH_4^+ oksidira do NO_2^- je več kot stoletje veljalo prepričanje, da ga vršijo nekatere bakterije iz razredov beta- in gama- proteobakterij. Pred slabim desetletjem so raziskovalci našli povezavo med geni mezofilnih arhej in genom *amoA*, ki kodira α -podenoto amonij-monooksigenaze. Kmalu za tem je raziskovalcem uspelo v čisti kulturi izolirati arhejo, ki oksidira NH_4^+ do NO_2^- , kar je bil neposreden dokaz da so poleg AOB v morskih okoljih oksidatorji NH_4^+ tudi arheje (AOA). Nadaljnje raziskave so pokazale, da so AOA veliko bolj razširjene kot AOB in danes veljajo kot najpomembnejši vršilci tega procesa v oceanih in priobalnih morjih.

V raziskovalnem delu smo želeli dobiti vpogled v razmerje med AOA in AOB, dinamiko njihovega pojavljanja tekom leta, vertikalno razporeditev ter raznolikost združbe AOA v plitvem pol-zaprtem morju Tržaškega zaliva. Rezultati so pokazali prevlado AOA nad AOB tako v površinskem kot tudi v pridnenem sloju tekom celega leta, kar je v skladu z dosedanjimi raziskavami. Prav tako je v skladu s podatki iz drugih morskih območji sezonska dinamika preučevanih AO, ki se v večjih koncentracijah pojavljajo v hladnejših mesecih, v našem primeru meseca novembra v pridnenem in decembra v površinskem sloju. Kateri dejavniki vplivajo na takšno razporeditev še ni povsem znano, saj jasne povezave z razširjenostjo AO in koncentracijami njihovega primerne vira energije-amonija ni mogoče zaznati. Ravno tako nismo zaznali statistično značilne povezave z razširjenostjo AO in ostalimi okoljskimi dejavniki (slanost, temperatura, bakterijska produkcija ogljika, pH...), razen z koncentracijami NO_2^- in NO_3^- , ki sta produkt njihovega metabolizma. Nekateri avtorji poročajo o negativni korelaciji s koncentracijo klorofila-a

oziroma razširjenostjo večjih fitoplanktonskih vrst, kar smo deloma potrdili tudi v naši raziskavi.

Pokazali smo tudi, da se sestava združbe najbolj razširjenih AO v Tržaškem zalivu – amonij- oksidirajočih arhej spreminja tekom leta. Zaznali smo spremembo združbe na podlagi variabilnosti gena *amoA*, med toplejšim in hladnejšim obdobjem. Ugotovili smo, da na višku razširjenosti (november , december) pa prevladuje en sam genotip. Na podlagi zaporedja gena *amoA* se AOA iz hladnejšega dela leta uvrščajo v »*N .maritimus*-sorodni« podklaster – v skupino I, medtem ko se AOA ki prevladujejo v poletnem času uvrščajo v »*N .maritimus*-sorodni« podklaster –v skupino II.

Arhejsko in bakterijsko združbo ter prisotnost oksidatorjev amonija smo želeli analizirati tudi v delcih morskega snega ter večjih agregatih, ki so zelo značilni za območja Severnega Jadrana, še posebej za Tržaški zaliv. Pojav morskih agregatov, ki je v zadnjih 20 letih bolj pogost povezujemo z razcveti fitoplanktonskih vrst ob povečanih vnosih hranil s pritoki rek ter neučinkovito bakterijsko razgradnjo s primarno produkcijo nastale organske snovi. Morski sneg in agregati, so tako skupki organske snovi, najpogosteje sestavljene iz kompleksnih polisaharidov, ki v svoje strukture ujamejo različne delce (fekalni peleti zooplanktona, aktivne fitoplanktonske celice, detritni delci višjih rastlin in odmrlih evkariontov ter mineralni delci). Agregati so običajno obogateni z organsko snovjo in poseljeni z gosto mikrobno združbo, ki aktivno razgrajuje organsko snov.

Na morskih agregatih iz Tržaškega zaliva smo z mikroskopsko analizo po označevanju celic z metodo CARD-FISH, ugotovili da je delež arhejskih skupin večji na agregatih in morskem snegu kot v okolni vodi, predvsem na račun *Euryarchaeota*. Filogenetska analiza arhejske združbe na podlagi raznolikosti 16S rRNA genov, je pokazala prevlado amonij-oksidirajočih arhej sorodnih arheji *N. maritimus*, tako decembra kot tudi avgusta v obeh preučevanih tipih vzorcev. Na podlagi zaporedij ki so smo jih poleg prevladujoče AOA, zaznali v morskem snegu decembra, sklepamo, da v tem obdobju zaradi večje preturbacije vodnega stolpca nekateri delci in celice izvirajo tudi iz sedimenta. Na velikih sluznih agregatih ki so se pojavili poleti arhejske združbe nismo mogli analizirati zaradi neuspeha pri pomnoževanju genov 16S rRNA.

Bakterijske združbe ki so prisotne na delcih morskega snega in agregatov ter v okolni vodi v različnih letnih časih kažejo sezonsko vezano sestavo združbe, neodvisno od okoljske niše ki jo zasedajo. Podrobnejša filogenetska analiza pa je pokazala, da so v vseh vzorcih najbolj razširjene bakterije iz razredov *Cyanobacteria*, *Alpha-* in *Gamma- Proteobacteria* ter *Bacteroidetes* (CFB), med vzorci pa njihov delež variira. Analiza združbe na nižji taksonomskem nivoju je pokazala velik delež bakterij iz družine *Vibrionaceae* v velikih agregatih avgusta, govori o tem da gre za starejše agregate, ki so zaradi stabilnih poletnih razmer v vodnem stolpcu prisotni dlje časa. Pojav določenih bakterijskih vrst v decembrskem morskem snegu in okolni vodi pa priča o vplivu povišanih vnosov sladke vode in povečanem mešanju vodnih mas na strukturo združbe tako v vodi kot na organskih delcih.

Da bi lahko preučili fiziološke in metabolne lastnosti AOA v Tržaškem zalivu smo v obogateni kulturi izolirali amonij- oksidirajočo arhejo iz morske vode Tržaškega zaliva. Arheja kaže visoko podobnost z že izolirano arhejo *N. maritimus* (99 % na podlagi 16S rRNA zaporedja, ter 94 -97 % na genu *amoA*). Obogatena arheja vrši skoraj stehiometrično pretvorbo NH_4^+ do NO_2^- , kar potrjuje da gre za amonij-oksidirajočo arhejo. Izmerjen temperaturni optimum kulture, je čeprav izolirana iz morske vode novembra, $\sim 30^\circ\text{C}$, optimalna pH vrednost pa mnogo nižja (7,5) od pH vrednosti morske vode. Morfologija arheja v obogateni kulturi se je prav tako ujemala z morfologijo celic arheje *N. maritimus*. Z SEM analizo smo opazili 1 μm dolge in 0,2 μm široke celice pravilne paličaste oblike. Na podlagi lastnosti obogatene AOA ter raznolikosti AOA v oceanih sklepamo, da je arheja iz vrste *N. maritimus* ki pripada arhejski skupini 1.1a (*Thaumarchaeota*), najbolj enostavna za gojenje v laboratorijskih kulturah z uporabljenimi metodami, saj nekatere filogenetsko bolj oddaljene skupine morskih AOA še nimajo v kulturi obogatenega predstavnika.

7.3 SUMMARY

During the degradation of organic matter different inorganic compounds are released in marine environment. Ammonium (NH_4^+) which is produced in the ammonification process is being oxidized into nitrate (NO_3^-) by nitrifiers in the oxygenic layers of the water column during the process of nitrification, an important part of global nitrogen cycle. The first, rate-limiting step, of nitrification process is NH_4^+ oxidation, which is conducted in two steps by two different groups of microorganisms. For the first of these two steps, the oxidation of NH_4^+ into NO_2^- it was generally believed that it is conducted by *Beta-* and *Gamma-Proteobacteria*. The application of new sequencing methods, approximately a decade ago, revealed the true phylogenetic diversity of a given habitat and provided an insight into microorganisms that cannot be cultivated. Using these new techniques in the study of the metagenome from Sargasso Sea seawater sample Venter and his colleagues (2004) discovered the connection between 16S rRNA mesophilic archaeal genes and homologues of bacterial *amoA* gene, coding for α -subunit of ammonium monooxygenase, the enzyme responsible for the first step in the ammonium oxygenation. Shortly after, a pure culture of archaea was isolated that was capable of oxygenizing NH_4^+ into NO_2^- , which was a direct evidence that in the marine environment this process is conducted by ammonia oxidizing bacterial (AOB) as well as ammonia oxidizing archaea (AOA). Further studies have shown that AOA are more abundant than AOB and today it is believed that they are the main players in this process in the coastal seas and oceans.

The main aim of this thesis was to get an insight into ratio between AOA and AOB, their annual dynamic, vertical distribution and diversity within AOA community in the shallow, semi-closed marine ecosystem of the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). Our results have shown that AOA dominated over AOB in the subsurface as well as in the layer above bottom of the water column, throughout the year, which is in accordance with previous data. AOA were more abundant during colder months (above the bottom in November, at the subsurface in December), in agreement with previous reports from other coastal environments. However, it is not clear which parameters govern their occurrence during these months, since no clear connection between AOA and NH_4^+ concentrations was observed so far. Several authors report on negative correlation between chlorophyll *a* concentration, or

presence of larger phytoplankton groups, which was partly shown also in this study. Further we show that the composition of AO is changing throughout the year in the Gulf of Trieste. The change of community composition was detected on the basis of *amoA* gene variability among warmer and colder period, however at the peak of their abundance only one genotype dominates. We conclude that the change in community composition is induced by mixing of the water column in the autumn, when specific genotypes could emerge from the sediment or be brought into the gulf with deep water mass from the south.

To examine whether AOA and AOB are also present in marine snow and larger organic aggregates, which are characteristic for the North Adriatic sea, we assessed the composition of marine snow- attached and free-living archaeal and bacterial community. Aggregates are usually highly enriched with organic matter and thus inhabited by diverse microbial community. Analysis of the northern Adriatic aggregates showed higher relative ratio of archaeal groups as compared to bacterial number. Phylogenetic analysis of archaeal community showed prevalence of *N. maritimus* -like archaeal clones in both type of samples (December –ambient water and aggregates, August- ambient water), while AOB were not detected in any of examined samples. Analysis of archaeal community associated with large mucous aggregates in August was not successful, due to 16S rRNA gene amplification problems.

Bacterial community associated with marine snow and larger organic aggregates show seasonally- dependant community structure, suggesting that marine snow-associated prokaryotic communities are subjected to successional changes similar to ambient water communities. Bacterial community on marine snow, aggregates and in seawater is mostly dominated by the members of four bacterial taxa: *Cyanobacteria*, *Alpha*- and *Gamma* – *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*, while certain bacterial and archaeal groups were exclusively associated to summer or autumn marine snow. However, the presence of bacterial groups detected almost exclusively in marine snow (*Vibrionales* and sulphate reducing bacteria) indicates that this specific physical and chemical microenvironment favours some specific bacterial groups and indicates different origin of aggregate forming material from different seasons.

To get a better insight in physiology and metabolic traits of AOA from the Gulf of Trieste we obtained AOA in enrichment culture (~98 %), from November seawater sample, which phylogenetically belongs to genus *Nitrosopumilus*. Isolates perform nearly stoichiometric conversion of NH_4^+ to NO_2^- , which proves that the archaea is AO. The enriched AOA have temperature optimum of ~30 °C, and pH optimum between 7,2 and 7,5. SEM analysis of the culture showed the prevalence of rod-shaped cells, ~1 µm long and 0,2 µm wide.

8 VIRI

- Agogue H., Brink M., Dinasquet J., Herndl G.J. 2008. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature*, 456, 7223: 788-791
- Allredge A.L., Cole J.J., Caron D.A. 1986. Production of heterotrophic bacteria inhabiting macroscopic organic aggregates (marine snow) from surface waters. *Limnology and Oceanography*, 31, 1: 68-78
- Allredge A.L., Silver M.W. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography*, 20, 1: 41-82
- Alonso-Sáez L., Waller A.S., Mende D.R., Bakker K., Farnelid H., Yager P.L., Lovejoy C., Tremblay J.-É., Potvin M., Heinrich F., Estrada M., Riemann L., Bork P., Pedrós-Alió C., Bertilsson S. 2012. Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 44: 17989-17994
- Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W., Devereux R., Stahl D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 6: 1919-1925
- Arp D., Sayavedra-Soto L., Hommes N. 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Archives of Microbiology*, 178, 4: 250-255
- Asman W.A.H., Harrison R.M., Ottley C.J. 1994. Estimation of the net air-sea flux of ammonia over the southern bight of the North Sea. *Atmospheric Environment*, 28, 22: 3647-3654
- Azam F., Long R.A. 2001. Oceanography: Sea snow microcosms. *Nature*, 414, 495-498
- Bange H.W. 2009. Gaseous nitrogen compounds (NO, N₂O, N₂, NH₃) in the ocean. V: Nitrogen in the marine environment. Capone D.G., Bronk D.A., Mulholland M.R., Carpenter E.J. (eds.), Amsterdam, Elsevier: 52 - 84
- Bano N., Hollibaugh J.T. 2000. Diversity and distribution of DNA sequences with affinity to ammonia-oxidizing Bacteria of the β subdivision of the class *Proteobacteria* in the Arctic ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5: 1960-1969
- Bano N., Ruffin S., Ransom B., Hollibaugh J.T. 2004. Phylogenetic composition of Arctic ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2: 781-789

- Baum M., Kainovic A., O'Keeffe T., Pandita R., McDonald K., Wu S., Webster P. 2009. Characterization of structures in biofilms formed by a *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 9, 1: 103
- Beman J.M., Popp B.N., Francis C.A. 2008. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 2, 4: 429-441
- Beman J.M., Roberts K.J., Wegley L., Rohwer F., Francis C.A. 2007. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 17: 5642-5647
- Beman J.M., Sachdeva R., Fuhrman J.A. 2010. Population ecology of nitrifying archaea and bacteria in the Southern California Bight. *Environmental Microbiology*, 12, 5: 1282-1292
- Bintrim S.B., Donohue T.J., Handelsman J., Roberts G.P., Goodman R.M. 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1: 277-282
- Bollmann A., Bär-Gilissen M.-J., Laanbroek H.J. 2002. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 10: 4751-4757
- Bostrom K.H., Simu K., Hagstrom A., Riemann L. 2004. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnology and Oceanography-Methods*, 2, 365-373
- Braker G., Conrad R. 2011. Diversity, structure, and size of N₂O producing microbial communities in soils—what matters for their functioning? V: *Advances in microbiology*. Laskin A., Sariaslani S., Gadd G.M. (eds.), Burlington, MA., Academic Press: 33–70
- Brochier-Armanet C., Boussau B., Gribaldo S., Forterre P. 2008. Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 3: 245-252
- Buckley D.H., Graber J.R., Schmidt T.M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 11: 4333-4339
- Campbell B.J., Yu L., Heidelberg J.F., Kirchman D.L. 2011. Activity of abundant and rare bacteria in a coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 31: 12776-12781

- Caron D.A. 1987. Grazing of attached Bacteria by heterotrophic microflagellates. *Microbial Ecology*, 13, 3: 203-218
- Church M.J., Wai B., Karl D.M., DeLong E.F. 2010. Abundances of crenarchaeal *amoA* genes and transcripts in the Pacific Ocean. *Environmental Microbiology*, 12, 3: 679-688
- Comici C., Bussani A. 2007. Analysis of the River Isonzo discharge (1998–2005). *Bolletino di Oceanologia Teorica ed Applicata*, 48, 435-454
- Coolen M.J.L., Abbas B., van Bleijswijk J., Hopmans E.C., Kuypers M.M.M., Wakeham S.G., Damste J.S.S. 2007. Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: A basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environmental Microbiology*, 9, 4: 1001-1016
- Costa E., Perez J., Kreft J.U. 2006. Why is metabolic labour divided in nitrification? *Trends in Microbiology*, 14, 5: 213-219
- Crump B.C., Baross J.A. 2000. Archaeoplankton in the Columbia river, its estuary and the adjacent coastal ocean, USA. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 3: 231-239
- Daims H., Brühl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, 22, 3: 434-444
- Damsté J.S.S., Schouten S., Hopmans E.C., van Duin A.C.T., Geenevasen J.A.J. 2002. Crenarchaeol. *Journal of Lipid Research*, 43, 10: 1641-1651
- Danovaro R., Fonda Umani S., Pusceddu A. 2009. Climate change and the potential spreading of marine mucilage and microbial pathogens in the Mediterranean Sea. *PLoS One*, 4, 9: e7006
- De Corte D., Yokokawa T., Varela M.M., Agogue H., Herndl G.J. 2009. Spatial distribution of Bacteria and Archaea and *amoA* gene copy numbers throughout the water column of the eastern Mediterranean Sea. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 3, 2: 147-158
- De La Torre J.R., Walker C.B., Ingalls A.E., Könneke M., Stahl D.A. 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 10, 3: 810-818
- DeLong E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 12: 5685-5689

- DeLong E.F. 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 6: 649-654
- Fenchel T., Blackburn N. 1999. Motile chemosensory behaviour of phagotrophic protists: Mechanisms for and efficiency in congregating at food patches. *Protist*, 150, 3: 325-336
- Fowler S.W., Knauer G.A. 1986. Role of large particles in the transport of elements and organic compounds through the oceanic water column. *Progress in Oceanography*, 16, 3: 147-194
- Frame C.H., Casciotti K.L. 2010. Biogeochemical controls and isotopic signatures of nitrous oxide production by a marine ammonia-oxidizing bacterium. *Biogeosciences Discuss.*, 7, 2: 3019-3059
- Francis C.A., Beman J.M., Kuypers M.M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 1, 1: 19-27
- Francis C.A., Roberts K.J., Beman J.M., Santoro A.E., Oakley B.B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 41: 14683-14688
- Fuhrman J.A., McCallum K., Davis A.A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 356, 6365: 148-149
- Fuks D., Radic J., Radic T., Najdek M., Blazina M., Degobbi D., Smolaka N. 2005. Relationships between heterotrophic bacteria and cyanobacteria in the northern Adriatic in relation to the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment*, 353, 1-3: 178-188
- Galand P., Gutiérrez-Provecho C., Massana R., Gasol J.M., Casamayor E.O. 2010. Inter-annual recurrence of archaeal assemblages in the coastal NW Mediterranean Sea (blanes bay microbial observatory). *Limnology and Oceanography*,
- Giani M., Rinaldi A., Degobbi D. 2005. Mucilages in the Adriatic and Tyrrhenian Sea: An introduction. *Science of the Total Environment*, 353, 1-3: 3-9
- Gilch S., Meyer O., Schmidt I. 2009. A soluble form of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *V: Biological Chemistry*. p. 863
- Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M. 1999. *Methods of seawater analysis*. Third, completely revised and extended edition. Wiley-VCH, Weinheim, 77, 89: 160

- Gruber N. 2008. The marine nitrogen cycle: Overview and challenges. V: Nitrogen in the marine environment. Capone D.G., Bronk D.A., Mulholland M.R., Carpenter E.J. (eds.), Amsterdam, Elsevier: 1-50
- Gruber N., Galloway J.N. 2008. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451, 7176: 293-296
- Hallam S.J., Mincer T.J., Schleper C., Preston C.M., Roberts K., Richardson P.M., DeLong E.F. 2006. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine. *PLoS Biology*, 4, 4: e95
- Hashimoto L.K., Kaplan W.A., Wofsy S.C., McElroy M.B. 1983. Transformations of fixed nitrogen and N₂O in the Cariaco Trench. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 30, 6: 575-590
- Hatzenpichler R. 2012. Diversity, physiology and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Applied and Environmental Microbiology*,
- Hatzenpichler R., Lebedeva E.V., Spieck E., Stoecker K., Richter A., Daims H., Wagner M. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing *crenarchaeote* from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 6: 2134-2139
- Heissenberger A., Herndl G.J. 1994. Formation of high molecular weight material by free-living marine bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 111, 1: 129-135
- Heissenberger A., Leppard G., Herndl G. 1996a. Ultrastructure of marine snow. II. Microbiological considerations. *Marine Ecology Progress Series*, 135, 1: 299-308
- Heissenberger A., Leppard G.G., Herndl G.J. 1996b. Relationship between the intracellular integrity and the morphology of the capsular envelope in attached and free-living marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 12: 4521-4528
- Herfort L., Schouten S., Abbas B., Veldhuis M.J.W., Coolen M.J.L., Wuchter C., Boon J.P., Herndl G.J., Sinninghe Damsté J.S. 2007. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 62, 3: 242-257
- Herndl G.J., Arrieta J.M., Stoderegger K. 1999. Interaction between specific hydrological and microbial activity leading to extensive mucilage formation in the northern Adriatic Sea. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 35, 3: 405-410
- Holmes R.M., Aminot A., Kérouel R., Hooker B.A., Peterson B.J. 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56, 10: 1801-1808

- Hornek R., Pommerening-Roser A., Koops H.P., Farnleitner A.H., Kreuzinger N., Kirschner A., Mach R.L. 2006. Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 1: 147-155
- Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., van de Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M., Kuenen J.G. 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, 22, 5: 421-437
- Kaplan W.A. 1983. Nitrification. V: Nitrogen in the marine environment. Edward J. Carpenter D.G.C. (ed.), New York, Academic Press: 139-190
- Karl D.M., Knauer G.A., Martin J.H., Ward B.B. 1984. Bacterial chemolithotrophy in the ocean is associated with sinking particles. *Nature*, 309, 5963: 54-56
- Karner M.B., DeLong E.F., Karl D.M. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 6819: 507-510
- Kim B.K., Jung M.-Y., Yu D.S., Park S.-J., Oh T.K., Rhee S.-K., Kim J.F. 2011. Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil archaeon, "*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*" MY1. *Journal of Bacteriology*, 193, 19: 5539-5540
- Kjørboe T. 2001. Formation and fate of marine snow: Small-scale processes with large-scale implications. *Scientia Marina*, 65, 2: 57-71
- Kjørboe T., Grossart H.-P., Ploug H., Tang K., Auer B. 2004. Particle-associated flagellates: Swimming patterns, colonization rates, and grazing on attached bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 35, 2: 141-152
- Kjørboe T., Jackson G.A. 2001. Marine snow, organic solute plumes, and optimal chemosensory behavior of bacteria. *Limnology and Oceanography*, 46, 6: 1309-1318
- Konneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437, 7058: 543-546
- Kovac N., Faganeli J., Bajt O., Sket B., Orel B., Penna N. 2004. Chemical composition of macroaggregates in the northern Adriatic Sea. *Organic Geochemistry*, 35, 10: 1095-1104
- Kruskal J.B. 1964a. Multidimensional-scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29, 1: 1-27

- Kruskal J.B. 1964b. Nonmetric multidimensional-scaling - a numerical-method. *Psychometrika* 29, 2: 115-129
- Lam P., Jensen M.M., Lavik G., McGinnis D.F., Muller B., Schubert C.J., Amann R., Thamdrup B., Kuypers M.M. 2007. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 17: 7104-7109
- Lehtovirta-Morley L.E., Stoecker K., Vilcinskas A., Prosser J.I., Nicol G.W. 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 38: 15892-15897
- Letunic I., Bork P. 2007. Interactive tree of life (itol): An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23, 1: 127-128
- Li X., Jayachandran S., Nguyen H.-H.T., Chan M.K. 2007. Structure of the *Nitrosomonas europaea* Rh protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 49: 19279-19284
- Lindas A.-C., Bernander R. 2013. The cell cycle of archaea. *Nat Rev Micro*, 11, 9: 627-638
- Lipizer M., Cossarini G., Falconi C., Solidoro C., Fonda Umani S. 2011. Impact of different forcing factors on N:P balance in a semi-enclosed bay: The Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Continental Shelf Research*, 31, 16: 1651-1662
- Loescher C.R., Kock A., Koenneke M., LaRoche J., Bange H.W., Schmitz R.A. 2012. Production of oceanic nitrous oxide by ammonia-oxidizing archaea. *Biogeosciences Discuss.*, 9, 2: 2095-2122
- Logar K., Kopinc R., Bandelj P., Staric J., Lapanje A., Ocepek M. 2012. Evaluation of combined high-efficiency DNA extraction and real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in subclinically infected dairy cattle: Comparison with faecal culture, milk real-time PCR and milk ELISA. *BMC Veterinary Research*, 8, 1: 49
- Lozupone C., Hamady M., Knight R. 2006. UniFrac-an online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. *BMC Bioinformatics*, 7, 371
- Malačič, V., Petelin B. 2009. Climatic circulation in the Gulf of Trieste (northern Adriatic). *Journal of Geophysical Research*, 114, C7: C07002
- Malačič V., Petelin B. 2001. Gulf of Trieste. V: *Physical oceanography of the Adriatic Sea: Past, present and future* Cushman-Roisin B., Gacic M., Poulain P.-M., Artegiani A. (eds.), Dordrecht ; Boston, Kluwer Academic Press: 167-181

- Malej A., Mozetic P., Malacic V., Terzić S., Ahel M. 1995. Phytoplankton responses to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 120, 1: 111-121
- Martens-Habben W., Berube P.M., Urakawa H., de la Torre J.R., Stahl D.A. 2009. Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying *Archaea* and *Bacteria*. *Nature*, 461, 7266: 976-979
- Massana R., Murray A.E., Preston C.M., DeLong E.F. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1: 50-56
- Matsutani N., Nakagawa T., Nakamura K., Takahashi R., Yoshihara K., Tokuyama T. 2009. Enrichment of a novel marine ammonia-oxidizing archaeon obtained from sand of an eelgrass zone. *Microbes and Environments*, 26, 1: 23-29
- Merbt S.N., Stahl D.A., Casamayor E.O., Martí E., Nicol G.W., Prosser J.I. 2012. Differential photoinhibition of bacterial and archaeal ammonia oxidation. *FEMS Microbiology Letters*, 327, 1: 41-46
- Mincer T.J., Church M.J., Taylor L.T., Preston C., Karl D.M., DeLong E.F. 2007. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific subtropical gyre. *Environmental Microbiology*, 9, 5: 1162-1175
- Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 1: 62-71
- Mosier A.C., Allen E.E., Kim M., Ferriera S., Francis C.A. 2012a. Genome sequence of "*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*" BG20, a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon from the San Francisco Bay estuary. *Journal of Bacteriology*, 194, 8: 2119-2120
- Mosier A.C., Allen E.E., Kim M., Ferriera S., Francis C.A. 2012b. Genome sequence of "*Candidatus Nitrosopumilus salaria*" BD31, an ammonia-oxidizing archaeon from the San Francisco Bay estuary. *Journal of Bacteriology*, 194, 8: 2121-2122
- Mosier A.C., Francis C.A. 2008. Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environmental Microbiology*, 10, 11: 3002-3016
- Mozetič P., Francé J., Kogovšek T., Talaber I., Malej A. 2012. Plankton trends and community changes in a coastal sea (northern Adriatic): Bottom-up vs. Top-down control in relation to environmental drivers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115, 0: 138-148

- Mulder A., van de Graaf A.A., Robertson L.A., Kuenen J.G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 3: 177-183
- Munson M.A., Nedwell D.B., Embley T.M. 1997. Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 12: 4729-4733
- Murray A., Blakis A., Massana R., Strawzewski S., Passow U., Alldredge A., DeLong E. 1999. A time series assessment of planktonic archaeal variability in the Santa Barbara Channel. *Aquatic Microbial Ecology*, 20, 129-145
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Newell S.E., Fawcett S.E., Ward B.B. 2013. Depth distribution of ammonia oxidation rates and ammonia-oxidizer community composition in the Sargasso Sea. *Limnology and Oceanography*, 58, 4: 1491-1500
- O'Mullan G.D., Ward B.B. 2005. Relationship of temporal and spatial variabilities of ammonia-oxidizing Bacteria to nitrification rates in Monterey Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2: 697-705
- Obernosterer I., Herndl G.J. 1995. Phytoplankton extracellular release and bacterial growth: Dependence on the inorganic N: P ratio. *Marine Ecology Progress Series*, 116, 1: 247-257
- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 5, 9: 787-797
- Ouverney C.C., Fuhrman J.A. 2000. Marine planktonic Archaea take up amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 11: 4829-4833
- Park S.-J., Kim J.-G., Jung M.-Y., Kim S.-J., Cha I.-T., Ghai R., Martín-Cuadrado A.-B., Rodríguez-Valera F., Rhee S.-K. 2012a. Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, "*Candidatus Nitrosopumilus sediminis*" AR2, from Svalbard in the Arctic circle. *Journal of Bacteriology*, 194, 24: 6948-6949
- Park S.-J., Kim J.-G., Jung M.-Y., Kim S.-J., Cha I.-T., Kwon K., Lee J.-H., Rhee S.-K. 2012b. Draft genome sequence of an ammonia-oxidizing archaeon, "*Candidatus Nitrosopumilus koreensis*" AR1, from marine sediment. *Journal of Bacteriology*, 194, 24: 6940-6941

- Passow U., Alldredge A.L., Logan B.E. 1994. The role of particulate carbohydrate exudates in the flocculation of diatom blooms. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 41, 2: 335-357
- Pearson A., McNichol A.P., Benitez-Nelson B.C., Hayes J.M., Eglinton T.I. 2001. Origins of lipid biomarkers in Santa Monica Basin surface sediment: A case study using compound-specific $\Delta^{14}\text{C}$ analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65, 18: 3123-3137
- Pester M., Rattei T., Flechl S., Gröngroft A., Richter A., Overmann J., Reinhold-Hurek B., Loy A., Wagner M. 2012. *amoA*-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of *amoA* genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 14, 2: 525-539
- Pester M., Schleper C., Wagner M. 2011. The Thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 3: 300-306
- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F., DeLong E.F. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. Nov., sp. Nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13: 6241-6246
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J., Glöckner F.O. 2007. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, 21: 7188-7196
- Rabalais N.N. 2002. Nitrogen in aquatic ecosystems. *A Journal of the Human Environment*, 31, 2: 102-112
- Rath J., Wu K.Y., Herndl G.J., DeLong E.F. 1998. High phylogenetic diversity in a marine-snow-associated bacterial assemblage. *Aquatic Microbial Ecology*, 14, 3: 261-269
- Rinaldi A., Vollenweider R.A., Montanari G., Ferrari C.R., Ghetti A. 1995. Mucilages in Italian seas: The Adriatic and Tyrrhenian seas, 1988–1991. *Science of the Total Environment*, 165, 1–3: 165-183
- Rotthauwe J.H., Witzel K.P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 12: 4704-4712
- Ryther J.H., Dunstan W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171, 3975: 1008-1013

- Santoro A.E., Casciotti K.L. 2011. Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing archaea from the open ocean: Phylogeny, physiology and stable isotope fractionation. *The ISME Journal: Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 5, 11: 1796-1808
- Schaudinn C., Stoodley P., Kainovic A., O Keeffe T., Costerton B., Robinson D., Baum M., Ehrlich G., Webster P. 2007. Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. *Microbe magazine*, 2, 5: 231
- Schleper C., Holben W., Klenk H.P. 1997. Recovery of crenarchaeotal ribosomal DNA sequences from freshwater-lake sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1: 321-323
- Schleper C., Nicol G.W. 2010. Ammonia-oxidising Archaea – physiology, ecology and evolution. V: *Advances in microbial physiology*. Robert K.P. (ed.), Academic Press: 1-41
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 23: 7537-7541
- Schmidt I., Look C., Bock E., Jetten M.S.M. 2004. Ammonium and hydroxylamine uptake and accumulation in *Nitrosomonas*. *Microbiology*, 150, 5: 1405-1412
- Simon H.M., Dodsworth J.A., Goodman R.M. 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology*, 2, 5: 495-505
- Simon M., Alldredge A.L., Azam F. 1990. Bacterial carbon dynamics on marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 65, 3: 205-211
- Simon M., Grossart H.P., Schweitzer B., Ploug H. 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 28, 2: 175-211
- Sintes E., Bergauer K., De Corte D., Yokokawa T., Herndl G.J. 2013. Archaeal *amoA* gene diversity points to distinct biogeography of ammonia-oxidizing *Crenarchaeota* in the ocean. *Environmental Microbiology*, 15, 5: 1647-1658
- Smith D.C., Simon M., Alldredge A.L., Azam F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359, 6391: 139-142
- Sohm J.A., Webb E.A., Capone D.G. 2011. Emerging patterns of marine nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 7: 499-508

- Stachowitsch M., Fanuko N., Richter M. 1990. Mucus aggregates in the Adriatic Sea - an overview of stages and occurrences. *Marine Ecology-Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Di Napoli I*, 11, 4: 327-350
- Stahl D.A., De la Torre J.R. 2012. Physiology and diversity of ammonia-oxidizing Archaea. *Annual Review of Microbiology*, 66, 1: 83-101
- Stocker R., Seymour J.R., Samadani A., Hunt D.E., Polz M.F. 2008. Rapid chemotactic response enables marine bacteria to exploit ephemeral microscale nutrient patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 11: 4209-4214
- Supić N., Orlić M. 1999. Seasonal and interannual variability of the northern Adriatic surface fluxes. *Journal of Marine Systems*, 20, 1–4: 205-229
- Takai K., Oida H., Suzuki Y., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., Inagaki F., Nealson K.H., Horikoshi K. 2004. Spatial distribution of marine Crenarchaeota Group I in the vicinity of deep-Sea hydrothermal systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4: 2404-2413
- Teira E., Aken H.v., Veth C., Herndl G.J. 2006. Archaeal uptake of enantiomeric amino acids in the meso- and bathypelagic waters of the North Atlantic. *Limnology and Oceanography*, 51, 1: 60-69
- Teira E., Reinthaler T., Pernthaler A., Pernthaler J., Herndl G.J. 2004. Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence in situ hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by bacteria and archaea in the deep ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 4411-4414
- Teske A., Alm E., Regan J.M., Toze S., Rittmann B.E., Stahl D.A. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176, 21: 6623-6630
- Thingstad T.F., Hagstrom A., Rassoulzadegan F. 1997. Accumulation of degradable DOC in surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnology and Oceanography*, 42, 2: 398-404
- Tourna M., Stieglmeier M., Spang A., Könneke M., Schintlmeister A., Urich T., Engel M., Schlöter M., Wagner M., Richter A., Schleper C. 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 20: 8420-8425
- Tremblay P.-L., Hallenbeck P.C. 2009. Of blood, brains and bacteria, the Amt/Rh transporter family: Emerging role of Amt as a unique microbial sensor. *Molecular Microbiology*, 71, 1: 12-22

- Treusch A.H., Leininger S., Kletzin A., Schuster S.C., Klenk H.P., Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7, 12: 1985-1995
- Turk V., Hagstrom A., Kovac N., Faganeli J. 2010. Composition and function of mucilage macroaggregates in the northern Adriatic. *Aquatic Microbial Ecology*, 61, 3: 279-289
- Turk V., Mozetic P., Malej A. 2007. Overview of eutrophication-related events and other irregular episodes in Slovenian Sea (Gulf of Trieste, Adriatic sea). *Annales. Series historia naturalis* 17s: 197-216
- Urakawa H., Martens-Habbena W., Stahl D.A. 2011. Physiology and genomics of ammonia-oxidizing archaea. V: *Nitrification*. Ward B.B., Arp D.J., Klotz M.G. (eds.), Washington, ASM Press: 115-156
- Urakawa H., Tajima Y., Numata Y., Tsuneda S. 2008. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3: 894-900
- Vajrala N., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L.A., Schauer A., Bottomley P.J., Stahl D.A., Arp D.J. 2013. Hydroxylamine as an intermediate in ammonia oxidation by globally abundant marine archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 3: 1006-1011
- Van Kim C.L., Colin Y., Cartron J.-P. 2006. Rh proteins: Key structural and functional components of the red cell membrane. *Blood Reviews*, 20, 2: 93-110
- Vetriani C., Reysenbach A.-L., Doré J. 1998. Recovery and phylogenetic analysis of archaeal rRNA sequences from continental shelf sediments. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 1: 83-88
- Wahman D.G., Wulfeck-Kleier K.A., Pressman J.G. 2009. Monochloramine disinfection kinetics of *Nitrosomonas europaea* by propidium monoazide quantitative PCR and live/dead bacLight methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 17: 5555-5562
- Walker C.B., de la Torre J.R., Klotz M.G., Urakawa H., Pinel N., Arp D.J., Brochier-Armanet C., Chain P.S., Chan P.P., Gollabgir A., Hemp J., Hugler M., Karr E.A., Konneke M., Shin M., Lawton T.J., Lowe T., Martens-Habbena W., Sayavedra-Soto L.A., Lang D., Sievert S.M., Rosenzweig A.C., Manning G., Stahl D.A. 2010. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 19: 8818-8823

- Ward B.B. 2011. Nitrification: An introduction and overview of the state of the field. V: Nitrification. Bess B. Ward D.J.A., Martin G. Klotz (ed.), Washington DC, ASM Press: 1-8
- Ward B.B., O'Mullan G.D. 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing γ -*Proteobacterium*, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 4153-4157
- Weidinger K., Neuhauser B., Gilch S., Ludewig U., Meyer O., Schmidt I. 2007. Functional and physiological evidence for a rhesus-type ammonia transporter in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiology Letters*, 273, 2: 260-267
- Welker C., Nichetto P. 1996. The influence of mucous aggregates on the microphytobenthic community in the northern Adriatic Sea. *Marine Ecology*, 17, 1-3: 473-489
- Winogradsky S.N. 1890. Recherches sur les organismes de la nitrification. *Annales de l'Institut Pasteur*, 4, 213-231
- Wright J.J., Konwar K.M., Hallam S.J. 2012. Microbial ecology of expanding oxygen minimum zones. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 6: 381-394
- Wuchter C., Abbas B., Coolen M.J.L., Herfort L., van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G.J., Middelburg J.J., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 33: 12317-12322
- Wuchter C., Schouten S., Boschker H.T.S., Sinninghe Damsté J.S. 2003. Bicarbonate uptake by marine Crenarchaeota. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 2: 203-207
- Zanchettin D., Traverso P., Tomasino M. 2008. Po river discharges: A preliminary analysis of a 200-year time series. *Climatic Change*, 89, 3-4: 411-433
- Zoppini A., Puddu A., Fazi S., Rosati M., Sist P. 2005. Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucilaginous aggregates of the northern Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353, 1-3: 270-286

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici izr. prof. dr. Valentini Turk, ki mi je odprla vrata v svet morske mikrobiologije, za strokovno vodstvo ter za ves trud, ki ga je vložila vame in v predstavljeno delo.

Hvala moji somentorici prof. dr. Kristini Gruden za strokovno pomoč tekom podiplomskega študija ter za obilo pozitivne energije.

Hvala članicama komisije prof. dr. Ines Mandić-Mulec in prof. dr. Branki Javornik za pregled doktorske disertacije in predloge za izboljšavo.

I would like to address special thanks to prof. dr. Gerhard Herndl for inviting me to his lab and letting me be a part of his research team, for his supervision and for giving me the opportunity to continue with my research.

I would also like to thank to prof. Christa Schleper and Michaela Stieglmeier for useful and crucial advice about archaea enrichment and cultivation.

Many thanks go to Eva Sintés for all her scientific answers to my endless questions and also for letting me be an “Alis-sitter” ☺

Thanks to Dominique Lamy who “made” me stay in Vienna. Thanks to all of you guys: Daniele, Itziar, Kristin, Pedro, Juan, Roberta, Jean-Marie, Bettina and the rest of the MOVIE group for useful debates, help in the lab and for many precious moments that made my time in Vienna unforgettable.

Hvala vsem sodelavcem iz Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo (NIB), še posebej Tini in Dejanu za vse predano znanje in obilo lepih spominov, ki sem jih odnesla s seboj na morje.

Za pomoč in nasvete hvala vsem sodelavcem iz Morske biološke postaje v Piranu, še posebej pa moji “delavni mentorici” Tinkari za cel paket praktičnega znanja, nasvetov in

nešteto debat. Prav posebna zahvala pa gre dragim mojim DR-MR društvu MBP (Mateji, Tinkari, Neli, Neži, Ivi, Katki, Katji, Tjaši, Manji, Petri Lučki, Jani, Gašperju, Borutu, Tihiju, Markotu, Martinu in Matjažu) za vse dogodivščine tako v službi, kot tudi po njej. Predvsem pa hvala mojim puncam za redne in neprecenljive vzpodbude, brez katerih bi bilo vse nepredstavljivo težje.

Hvala tudi celi moji dunajski “družini” (Ursuli, Urši&Gregorju, Maji&Rolandu, Črtu, Viktorju&Ireni in Danielu) za vse prevožene kilometre, prevode in pomoč pri reševanju birokratskih ugank, predvsem pa za vse nepozabne trenutke, ki sem jih z vami preživela in zaradi katerih se zdi Dunaj še veliko lepši.

Hvala vsem ostalim prijateljem (Toniju, Tini, Mihi, Meti, Tanji, Janji, Lukiju&Petji, Primziju, Mokiju ...) ter vsem sorodnikom, ki so mi polepšali marsikateri trenutek in vsem, ki so kakorkoli prispevali k nastanku tega dela.

.....

Prav posebna zahvala pa gre mojim staršem in moji sestri, ki so verjeli vame, me bodrili, tolažili, skrbeli zame ... in tudi finančno pripomogli k uresničitvi mojih ciljev.

Nenazadnje hvala tebi Tomaž za vso potrpežljivost in tudi za nepotrpežljivost ☺, za vse znanstvene nasvete in pomoč pri delu ter hvala za varen pristan.

PRILOGE

Priloga A: Sestava pufrov uporabljenih pri metodi CARD-FISH

Založna raztopina reagenta	Količina	Končna koncentracija
Hibridizacijski pufer s 55 % formamidom za hibridizacijo bakterijskih sond		
Dextran Sulfat	1 g	10 %
5 M NaCl	1800 µl	900 mM
1 M Tris-HCl	200 µl	20 mM
100 % Triton X100	5 µl	0,05 %
Formamid	5500 µl	55 %
10 % Blocking reagent	1000 µl	1 %
H ₂ O (Sigma)	1500 µl	
Hibridizacijski pufer s 20 % formamidom za hibridizacijo arhejskih sondami		
Dextran Sulfat	1 g	10 %
5 M NaCl	1800 µl	900 mM
1 M Tris-HCl	200 µl	20 mM
100 % Triton X100	5 µl	0,05 %
Formamid	2000 µl	20 %
10 % Blocking reagent	1000 µl	1 %
H ₂ O (Sigma)	5000 µl	
Pufer za spiranje po hibridizaciji z bakterijskimi sondami		
5 M NaCl	30 µl	13 mM
1 M Tris-HCl	1000 µl	20 mM
0,5 M EDTA	500 µl	5 mM
ddH ₂ O	48420 µl	
10 % SDS	50 µl	0,01 %

se nadaljuje

nadaljevanje

Založna raztopina reagenta	Količina	Končna koncentracija
Pufer za spiranje po hibridizaciji z arhejskimi sondami		
5 M NaCl	1350 µl	145 mM
1 M Tris-HCl	1000 µl	20 mM
0,5 M EDTA	500 µl	5 mM
ddH ₂ O	47100 µl	
10 % SDS	50 µl	0,01 %
Amplifikacijski pufer		
Dextran Sulfate	2 g	10 %
5M NaCl	8000 µl	2 M
10 % Blocking reagent	200 µl	0,1 %
1x PBS	11800 µl	
10 % Blocking reagent		
Blocking reagent (Roche)	10 g	
Pufer maleinske kisline (100 mM maleinska		
kislina, 150 mM NaCl; pH 7,5)	100 ml	

Priloga B1: Rezultati kvantifikacije gena *amoA* z metodo qPCR na globini 5 m tekom leta (april 2010 – marec 2011)

	AOA <i>amoA</i>		AOB <i>amoA</i>	
	Št. kopij/ml	SD	Št. kopij/ml	SD
april	$6,3 \times 10^1$	3,6	pod LOQ*	/
maj	$6,0 \times 10^2$	$4,3 \times 10^1$	pod LOQ*	/
junij	$1,8 \times 10^2$	$2,9 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$
julij	$3,4 \times 10^2$	$2,7 \times 10^1$	$5,6 \times 10^1$	2,9
avgust	$2,8 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	3,3
september	$9,0 \times 10^2$	$5,8 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	8,1
oktober	$6,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	7,0
november	$2,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$	6,2
december	$9,9 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^2$
januar	$4,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^1$	1,9
februar	$3,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$4,6 \times 10^1$	4,1
marec	$3,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	$1,6 \times 10^1$	0,62

* število genov v vzorcu je pod mejo kvantifikacije metode, ki znaša 10 kopij

Priloga B2: Rezultati kvantifikacije gena *amoA* z metodo qPCR na globini 21 m tekom leta (april 2010 – marec 2011)

	AOA <i>amoA</i>		AOB <i>amoA</i>	
	Št. kopij/ml	SD	Št. kopij/ml	SD
april	$1,6 \times 10^2$	$1,7 \times 10^1$	$4,2 \times 10^1$	3,0
maj	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
junij	$2,6 \times 10^2$	$1,7 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	3,8
julij	$5,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$
avgust	$2,4 \times 10^2$	$3,3 \times 10^1$	$7,4 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
september	$6,3 \times 10^2$	$9,1 \times 10^1$	$7,6 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
oktober	$4,7 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$9,8 \times 10^1$	$2,9 \times 10^1$
november	$1,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$4,8 \times 10^2$	$3,2 \times 10^1$
december	$5,8 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	$6,6 \times 10^1$
januar	$7,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^2$	$7,2 \times 10^1$	8,6
februar	$5,1 \times 10^3$	$8,3 \times 10^1$	$6,5 \times 10^1$	5,2
marec	$4,4 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	$5,1 \times 10^1$	$1,4 \times 10^1$

Priloga B3: Rezultati kvantifikacije genov *amoA* vzdolž vodnega stolpca meseca julija 2010

Globina (m)	AOA <i>amoA</i>		AOB <i>amoA</i>	
	Št. kopij/ml	SD	Št. kopij/ml	SD
1 m	$5,4 \times 10^1$	8,2	pod LOQ*	/
3 m	$8,7 \times 10^1$	$2,2 \times 10^1$	pod LOQ*	/
5 m	$3,4 \times 10^2$	$2,7 \times 10^1$	$5,6 \times 10^1$	2,9
10 m	$1,3 \times 10^2$	8,7	pod LOQ*	/
15 m	$8,3 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$	pod LOQ*	/
21 m	$5,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$7,1 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$

* število genov v vzorcu je pod mejo kvantifikacije metode, ki znaša 10 kopij

Priloga B4: Rezultati kvantifikacije genov *amoA* vzdolž vodnega stolpca meseca februarja 2011

Globina (m)	AOA <i>amoA</i>		AOB <i>amoA</i>	
	Št. kopij/ml	SD	Št. kopij/ml	SD
1 m	$7,7 \times 10^3$	$2,9 \times 10^2$	$3,6 \times 10^1$	1,4
3 m	$7,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$	7,9
5 m	$3,7 \times 10^3$	$9,3 \times 10^1$	$4,6 \times 10^1$	4,1
10 m	$2,5 \times 10^3$	$9,0 \times 10^1$	$3,9 \times 10^1$	4,4
15 m	$3,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$3,5 \times 10^1$	6,6
21 m	$6,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$	$6,5 \times 10^1$	5,2

Priloga C1: Fizikalno-kemijski parametri izmerjeni na globini 5 m ob vzorčenju morske vode za namen kvantifikacije genov

amoA

Datum vzorčenja			Ts	S	pHs	Kisik (ml/l)	NO ₂ ⁻ (μmol/l)	NO ₃ ⁻ (μmol/l)	NH ₄ ⁺ (μmol/l)	SiO ₄ ⁴⁻ (μmol/l)	PO ₄ ³⁻ (μmol/l)	P _{tot} (μmol/l)	N _{tot} (μmol/l)	BCP (μg C /l /d)
23.	april	2010	14,6	36,1	8,37	5,15	0,18	4,00	0,52	3,60	0,07	0,28	15,9	2,33
7.	maj	2010	16,6	36,1	8,24	4,76	0,12	2,34	0,35	4,90	0,07	0,23	11,3	3,01
7.	junij	2010	21,5	33,5	8,25	3,95	0,11	4,57	0,43	3,56	0,05	0,20	17,9	10,34
15.	julij	2010	28,3	31,4	8,36	4,95	0,13	4,53	0,98	8,30	0,13	0,44	21,2	23,15
12.	avgust	2010	25,2	34,3	8,26	3,34	0,02	0,11	1,78	2,55	0,04	0,25	11,7	9,43
23.	september	2010	21,5	35,3	8,21	6,14	0,04	0,32	0,32	5,77	0,14	0,24	9,1	7,90
22.	oktober	2010	17,0	35,9	8,28	5,19	0,69	2,34	0,23	6,91	0,02	0,37	20,7	4,39
18.	november	2010	15,2	34,4	8,22	5,761	1,15	9,08	0,34	4,75	0,15	0,42	29,8	5,96
14.	december	2010	13,1	36,6	8,24	5,143	0,90	6,42	0,19	8,86	0,15	0,35	25,4	2,69
13.	januar	2011	10,0	37,0	8,23	5,52	0,74	5,32	0,31	3,55	0,07	0,23	15,6	1,30
15.	februar	2011	9,3	37,2	8,24	6,16	0,42	2,79	0,04	2,94	0,04	0,24	14,8	2,80
18.	marec	2011	9,4	37,1	8,25	5,89	0,35	4,13	0,14	4,60	0,05	0,23	15,9	2,79

Priloga C2: Fizikalno-kemijski parametri izmerjeni na globini 21 m ob vzorčenju morske vode za namen kvantifikacije genov

amoA

Datum vzorčenja			Ts	S	pHs	Kisik (ml/l)	NO ₂ ⁻ (μmol/l)	NO ₃ ⁻ (μmol/l)	NH ₄ ⁺ (μmol/l)	SiO ₄ ⁴⁻ (μmol/l)	PO ₄ ³⁻ (μmol/l)	P _{tot} (μmol/l)	N _{tot} (μmol/l)	BCP (μg C /l /d)
23.	april	2010	9,88	37,5	8,34	6,11	0,11	0,42	0,63	3,00	0,09	0,33	9,2	1,66
7.	maj	2010	11,6	37,2	8,25	5,62	0,09	0,71	0,87	5,21	0,10	0,30	10,3	2,39
7.	junij	2010	13,3	37,0	8,11	5,75	0,19	1,70	2,91	3,70	0,08	0,34	16,1	7,97
15.	julij	2010	15,3	36,7	8,10	7,18	0,27	2,13	3,55	8,40	0,16	0,54	18,0	12,06
12.	avgust	2010	17,5	37,2	8,09	4,46	0,17	0,60	1,28	6,60	0,09	0,46	13,0	4,92
23.	september	2010	19,2	36,9	8,16	6,60	0,16	0,64	0,83	6,19	0,05	0,27	9,1	6,21
22.	oktober	2010	17,2	37,1	8,19	5,25	1,91	2,20	0,28	8,92	0,08	0,38	19,3	3,14
18.	november	2010	15,8	36,2	8,14	5,93	2,39	6,26	1,12	9,26	0,16	0,41	28,1	1,85
14.	december	2010	13,6	37,0	8,23	5,022	0,92	5,32	0,32	7,04	0,17	0,42	21,3	1,06
13.	januar	2011	10,4	37,2	8,22	5,290	0,84	4,23	0,43	3,54	0,09	0,28	15,1	1,41
15.	februar	2011	8,8	37,3	8,26	6,13	0,46	2,24	0,33	3,58	0,07	0,27	14,0	5,93
18.	marec	2011	8,8	37,5	8,26	5,87	0,26	1,80	0,55	5,00	0,08	0,25	18,4	1,07