

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Miha MIHELIČ

**POMEN PRŠENJA SLAPOV PRI RAZŠIRJANJU BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DISPERSAL OF MICROORGANISMS WITH THE HELP OF  
WATERFALLS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v Lapanjevem laboratoriju Inštituta za metagenomiko in mikrobnih tehnologij ter na Katedri za ekologijo, na oddelku za limnologijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Mihaela Jožefa Tomana, za somentorja dr. Aleša Lapanje in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:     asist. dr. Polona ZALAR  
Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član:             prof. dr. Mihael Jožef TOMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani, se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Miha Mihelič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Dd
- DK UDK 582.23:502.3(043.2) = 163.6
- KG bakterije/atmosfera/slap/sneg/voda/CFU/DNK/16S rRNK/PCR
- AV MIHELIČ, Miha
- SA TOMAN, Mihael Jožef (mentor)/LAPANJE, Aleš (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2015
- IN POMEN PRŠENJA SLAPOV PRI RAZŠIRJANJU BAKTERIJ
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 58 str., 11 pregl., 14 sl., 1 pril., 82 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Ugotavljali smo, ali bakterije, ki so s padavinami zapustile oblake, lahko iz vode s pomočjo aerosolov slapov ponovno vstopijo v atmosfero. Zanimalo nas je, ali se bodo pokazale kakšne tendence po tem, da se nekatere bakterije bolje aerosolizirajo iz vode kakor druge. Terensko delo smo opravljali v Zgornjem Posočju na dveh slapovih, Kozjak in Parabola. Vzorčili smo maja 2009 ter februarja oziroma marca 2010. Pri vsakem slapu smo izbrali po štiri vzorčna mesta; pri Kozjaku vodo iznad in izpod slapu ter dve mesti za zrak v različnih oddaljenostih od slapu. Pri Parabolli smo namesto vode nad slapom povzorčili sneg. Zrak smo vzorčili z vzorčevalnikom zraka RCS High Flow. Bakterije smo gojili na gojiščih NA in R2A ter njuni redčeni različici, 1/100 NA in 1/10 R2A. Tako smo primerjali vrstno sestavo bakterij med potokom, na katerega ima človek neposreden vpliv (Kozjak), ter potokom brez vpliva (Parabola), v odvisnosti od temperature vode in zraka. Na gojiščih z R2A in 1/10 R2A je bila v primerjavi z NA in 1/100 NA opažena boljša rast kolonij. Skupno nam je uspelo izolirati 650 sevov iz 51 različnih rodov. Najštevilčnejši je bil rod *Flavobacterium*, z 265 predstavniki, kar je 40,7 % v primerjavi z vsemi rodovi. Od vseh 265 sevov, jih je bilo 64,5 % povzorčenih v zraku, kar bi lahko nakazovalo dobre aerosolizacijske sposobnosti te skupine bakterij. Pri skupno petih rodovih smo pri obeh slapovih uspeli dokazati, da so se bakterije, ki so bile prisotne v vodi ali snegu nad slapom, pojavile v aerosolih obeh slapov. Pojav treh rodov patogenih enterobakterij nakazuje, da ekološko obremenjene vode preko aerosolov slapov lahko pospešujejo njihovo razširjanje po zraku.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dd

DC UDC 582.23:502.3(043.2) = 163.6

CX Classification terms: bacteria/atmosphere/waterfall/snow/water/CFU/DNA/16S  
rRNA/PCR

AU MIHELIC, Miha

AA TOMAN, Mihael Jožef (mentor)/LAPANJE, Aleš (co-mentor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

PY 2015

TI DISPERSAL OF MICROORGANISMS WITH THE HELP OF WATERFALLS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XI, 58 p., 11 tab., 14 fig., 1 ann., 82 ref.

LA sl

AL sl/en

AB We investigated if waterfall spray can enable bacteria to enter air phase again, after they had entered a mountain stream as part of raindrops or snowflakes in the process of precipitation. We studied if any of the sampled strains had any inclinations to enter air phase better than others. Field work was conducted in the Upper Soča valley, Slovenia, at waterfalls Kozjak and Parabola in May of 2009 and February and March of 2010. Each waterfall had four sampling sites; at Kozjat water was sampled from above and below the waterfall and air was sampled from two distinct locations in different distances from the waterfall. At Parabola, we sampled snow instead of water above the waterfall, the rest was indifferent. RCS High Flow microbe air sampler was used to sample the air. Bacteria was grown on NA and R2A plates and on their respective diluted versions, 1/100 NA and 1/10 R2A. We compared the isolated species between a stream, which is directly influenced by man and another that isn't. Assuming water and air temperature would have a considerable influence on the presence of bacteria, we conducted the field work in the winter and in the spring. In general, a significantly higher bacterial growth was detected on R2A and 1/10 R2A agar, comparing to NA and 1/100 NA. In total we managed to isolate 650 strands from 51 different genera. The most numerous was genus *Flavobacterium* with 265 strands, which is 40,7 % comparing to the total number of isolates. Within this genus, 64,5 % of the isolated strands were found in the air samples, which might indicate notable aerosolisation abilities. Combining results from both waterfalls, we proved that in five cases, bacteria, that were found in the water above the waterfall or in the snow, were also found in the aerosols. Three isolated pathogenic genera of the *Enterobacteriaceae* family indicate, that polluted water could contribute to their air dispersal via aerosols.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 POJAV BAKTERIJ V ZRAKU .....	3
2.2 PRILAGODITVE BAKTERIJ NA POGOJE V ZRAKU .....	4
2.3 MIKROORGANIZMI IN POJAV AEROSOLIZACIJE .....	7
<b>2.3.1 Razširjanje v atmosferi .....</b>	<b>9</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1 METODE .....	11
<b>3.1.1 Oris področja raziskave .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2 Vzorčenje .....</b>	<b>12</b>
3.2 MATERIALI .....	22
<b>3.2.1 Priprava gojišč .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.2 Štetje CFU in precepljanje kolonij .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4 Gelska elektroforeza .....</b>	<b>25</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>27</b>
4.1 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE .....	28

<b>4.1.1 Rezultati štetja CFU .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2 Rezultati sekvenciranja.....</b>	<b>31</b>
4.2 KEMIJSKO-FIZIKALNE ANALIZE.....	44
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>45</b>
5.1 RAZPRAVA.....	45
<b>5.1.1 Štetje CFU .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2 Rezultati sekvenciranja.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.3 Kemijsko-fizikalne analize.....</b>	<b>51</b>
5.2 SKLEPI.....	53
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>54</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>58</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

	Str.
Preglednica 1	Prikaz vzorčnih mest. 13
Preglednica 2	Sestavine za pripravo PCR mešanice. 24
Preglednica 3	Prikazane so izračunane p vrednosti primerjave med različnimi gojišči za vzorce iz vode pri slapu Kozjak. 30
Preglednica 4	Seznam rodov vseh izoliranih bakterij s številčnim prikazom količine izolatov, pridobljenih pri vseh štirih vzorčenjih. Številke predstavljajo število izoliranih sevov. 32-34
Preglednica 5	Primerjava bogatosti bakterijskih rodov med vzorci z uporabo diverzitetnega indeksa Chao 1. 35
Preglednica 6	Kvalitativni prikaz rodov bakterij iz Kozjaka, ki so bile izolirane v vseh štirih vzorčnih mestih. Izjemi sta <i>Flavobacterium</i> in <i>Chryseobacterium</i> iz leta 2009. Številke predstavljajo število posameznih sevov. 38
Preglednica 7	Prikaz rodov bakterij iz Parabole, ki so bile izolirane v vseh štirih vzorčnih mestih. Številke predstavljajo število posameznih sevov. 40
Preglednica 8	Primerjava med izolati rodu <i>Flavobacterium</i> iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri Paraboli. Številke predstavljajo število sevov. 42
Preglednica 9	Primerjava med izolati rodu <i>Flavobacterium</i> iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri Kozjaku. Številke predstavljajo število sevov. 42

Preglednica 10	Primerjava med izolati rodu <i>Flavobacterium</i> iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri obeh slapovih. Številke predstavljajo število sevov.	43
Preglednica 11	Vrednosti fizikalno-kemijskih meritev pri Kozjaku.	44
Preglednica 12	Vrednosti fizikalno-kemijskih meritev pri Paraboli.	44



**KAZALO SLIK**

	Str.
Slika 1 Rdeča krogca na zemljevidu predstavljata lego obeh slapov.	12
Slika 2 Vzorčna mesta pri slapu Kozjak, kjer smo pridobil vzorce »Voda tolmun« (A) ter »Zrak 1« (B). Poleg vzorčevalnika zraka je bila nameščena tudi meteorološka postaja (C), ki je merila zračni tlak, zračno vlago in temperaturo. Smer padca slapu je proti jugovzhodu.	14
Slika 3 Vzorčna mesta pri slapu Parabola, kjer smo pridobili vzorce »Voda tolmun« (A) ter »Zrak 1« (B) in »Zrak 2« (C). Smer padca slapu je proti severozahodu.	15
Slika 4 Ob vrtenju rotorja in rezila se skozi odprtine na obeh koncih bobna sesa zrak in tako enakomerno porazdeljuje aerosole na strip (Vir: Navodila za uporabnike: RCS High Flow Touch, Biotest, Nemčija).	16
Slika 5 V rdeči vrtljivi bobni, ki se z magnetom pritrdi na vzorčevalnik zraka RCS High Flow, se na terenu vstavi plastični strip, na katerem je medij za vzorčenje.	17
Slika 6 RCS High Flow (na mizici) ter meteorološka postaja za vzorčenje fizikalnih parametrov atmosfere.	17
Slika 7 Primer kromatograma nukleotidnega zaporedja.	27
Slika 8 Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/ml za vzorce vode in snega pri Paraboli, pridobljene maja 2009 in februarja 2010.	28
Slika 9 Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/m <sup>3</sup> za vzorce zraka pri Paraboli, pridobljene maja 2009 in februarja 2010.	29

- Slika 10 Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/ml za vzorce vode pri Kozjaku, pridobljene maja 2009 in marca 2010. 30
- Slika 11 Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/m<sup>3</sup> za vzorce zraka pri Kozjaku, pridobljene maja 2009 in marca 2010. 31
- Slika 12 Tortni diagram prikazuje število izoliranih rodov, ki pripadajo določeni višji sistematski skupini, ter kvantitativni delež te skupine glede na celokupno število vseh izolatov. 37
- Slika 13 Kladogram prikazuje med seboj sorodne seve roda *Janthinobacterium*, pridobljene marca 2010 iz slapa Kozjak. Črka "K" je okrajšava za Kozjak. K voda Drežnica-1 do K voda Drežnica 3 predstavljajo tri vzorce, izolirane v vodi potoka Kozjak pri vasi Drežnica. K voda tolmun-1 predstavlja vzorec, izoliran iz vzorca vode pri tolmunu pod slapom Kozjak. K zrak1-1 do K zrak1-3 predstavljajo tri vzorce, izolirane na prvem vzorčnem mestu za zrak, K zrak2-1 do K zrak2-4 pa štiri vzorce, izolirane na drugem vzorčnem mestu za zrak. Imena vseh izolatov, katere je kladogram uvrstil med najbližje sorodnike, imajo odebeljen tisk. Ob vejah so prikazane bootstrap vrednosti. 39
- Slika 14 Kladogram prikazuje med seboj sorodne seve roda *Janthinobacterium*, pridobljene maja 2009 iz slapa Parabola. Črka "P" je okrajšava za Parabolo, P sneg-1 do P sneg-11 predstavljajo enajst vzorcev, pridobljenih iz snega, deponiranega nad slapom. P voda-1 do P voda-4 predstavljajo štiri vzorce, izolirane iz vzorca vode pri tolmunu pod slapom Parabola. P zrak1-1 do P zrak1-6 predstavljajo šest vzorcev, izoliranih na prvem vzorčnem mestu za zrak, P zrak2-1 in P zrak2-2 pa dva vzorca, izolirana na drugem vzorčnem mestu za zrak. Imena vseh izolatov, katere je kladogram uvrstil med najbližje sorodnike, imajo odebeljen tisk. Ob vejah so prikazane bootstrap vrednosti. 41

## KAZALO PRILOG

Priloga A V preglednici je seznam nekaterih rodov, ki smo jih izolirali. Z znakom + smo zabeležili njihovo pojavljanje v literaturi.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNK geni za ribosomsko 16S RNK

CFU metoda določanja števila kolonij na trdnih gojiščih

DNK deoksiribonukleinska kislina

dNTP deoksiribonukleotid

PCR verižna reakcija s Taq polimerazo

## 1 UVOD

Atmosfera kot življenjski prostor je za živa bitja izjemnega pomena. Poleg vsebovanja plinov, ki so potrebni za osnovno delovanje organizmov, ter tistih snovi, ki uravnajo vplive iz vesolja, je nepogrešljiva še vloga atmosfere kot prostora. Tu se organizmi lahko gibajo v iskanju hrane, partnerjev ali gostiteljev. Ciklusi številnih prehranjevalnih verig potekajo v atmosferi. Številni zračni prostor uporabljajo kot glavni vektor za kolonizacijo novih območij, bodisi neposredno bodisi z razširjanjem svojih spor oz. semen. Največje razdalje med vsemi lahko premagujejo mikroorganizmi, ki zaradi svoje majhnosti te pojave s pridom uporabljajo. Ko ti vstopijo v atmosfero, jih imenujemo bioaerosoli. Pod to poimenovanje uvrščamo bakterije, glive, alge, praživali, njihove trajne oblike ali spore, viruse pa tudi cvetni prah. Kot bioaerosoli lahko vplivajo na kemizem in fizikalne dejavnike v atmosferi, torej na podnebje ter celotno biosfero in nenazadnje zdravje ljudi (Despres et al., 2007). Na dolge ali kratke razdalje jih prenašajo večinoma vetrovi, nahajajo pa se tudi v megli in oblakih (Fuzzi et al., 1997; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005, 2007). Morris in sod. (2011) celo govorijo o »atmosferskem biomu« kot ločenem globalnem ekosistemu z živahno aktivnostjo mikroorganizmov, ki bi se v tem okolju lahko celo razmnoževali. Kljub temu da je lahko atmosfera izredno pomemben medij za prenos mikroorganizmov, pa nam mikrobiologija zraka ponuja še veliko neznank.

Prvi, ki je omenil mikroorganizme v zraku, je bil Anton van Leeuwenhoek, leta 1676 (Gregory, 1971), nato je sredi 18. stoletja Lazaro Spallanzani njihov obstoj v zraku tudi dokazal (Capanna, 1999). Mikroorganizmi v zraku so bili prvič opazovani leta 1837 (Lighthart and Shaffer, 1995; Wainwright et al., 2003; Shinn et al., 2003). Leto 1847 pa se šteje kot začetek aerobiologije, ko je nemški mikrobiolog Christian Gottfried Ehrenberg objavil svojo monografijo: »Passatstaub und Blutregen – ein grosses organisches unsichtbares Wirken und Leben in des Atmosphäre«<sup>1</sup> (Krumbein 1995). Dve leti kasneje so bile objavljene skice organskih delcev, kot npr. cvetni prah, spore ter fragmenti organizmov (Ehrenberg 1849). Louis Pasteur pa je leta 1862 dokazal, da je vzrok za kvarjanje piva, vina in mleka v organizmih iz zraka. To spoznanje je kmalu vodilo k

---

<sup>1</sup> Pasatni prah in krvavi dež – obsežno, organsko, nevidno delovanje in življenje v atmosferi.

številnim izboljšavam v medicini ter preprečevanju bolezni, saj je bilo za številne bolezni ugotovljeno, da se prenašajo po zraku (Pasteur 1890a, b).

Da lahko bakterije izkoriščajo atmosfero, morajo biti sposobne prehoda v aerosolno fazo, prenosa po zraku, preživetja v zraku in depozicije nazaj na površino. O teh pojavih pa danes vemo premalo. Opazovanje sposobnosti aerosolizacije mikroorganizmov je v dosedanjih raziskavah večinoma omejeno na laboratorijske razmere in umetna okolja (čistilne naprave, bazeni), pri katerih pa ne dobimo vpogleda v sposobnost aerosolizacije mikroorganizmov v naravnem okolju. V takšnem okolju so pogoji drugačni tako na površini, kot v zraku, poleg tega pa v relativno stabilnih okoljih pričakujemo evolucijsko prilagojenost mikroorganizmov na takšne pogoje in s tem bolj relevantne rezultate glede njihove sposobnosti aerosolizacije. Eden takšnih primerov naravnega okolja je visokogorski slap. Zaradi padanja vode v globino in njenega mešanja ob padcu nastajajo vodne kapljice, v katere se lahko ujamejo mikroorganizmi, ki se lahko tako z zračnim tokom prenesejo iz vodnega okolja na novo površino. Tako smo predvidevali, da lahko slap služi kot lokalni aerosolizator. Ker se le-ta napaja s precipitacijo v gorah, lahko opazujemo povezavo med že aerosoliziranimi bakterijami v oblakih, ki padejo s padavinami na površje, in njihovo ponovno sposobnostjo aerosolizacije.

## **1.1 Namen dela**

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, katere bakterije ob precipitaciji v gorah svojo strmo pot navzdol nadaljujejo s potoki ter nato ob prehodu v slap, ujete v vodne aerosole, vstopijo nazaj v atmosfero. Terensko delo se je izvajalo na lokaciji, kjer človek na vodo nima neposrednega vpliva, ter na lokaciji z neposrednimi človeškimi vplivi. Zato je bilo pomembno preko vrstne sestave bakterij tudi ugotoviti razlike med obema vzorčnima mestoma. Pri organsko obremenjenem slapu smo pričakovali drugačno bakterijsko sestavo kot pri neobremenjenem. Na kvalitativni in kvantitativni način smo tudi želeli ugotoviti, katere bakterije se bolje aerosolizirajo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 Pojav bakterij v zraku

Od prvih eksperimentov Spallanzanija in Pasteurja (Capanna, 1999, Pasteur, 1890a, b) atmosfera za mikrobiologe še vedno predstavlja precejšnjo neznanko. Aerobiologija kot veda tako že 200 let raziskuje raznovrstnost mikroorganizmov ter njihove sposobnosti preživetja in potovanja v atmosferi. Pojavljajo se prosto v zraku pa tudi megli (Castello et al., 1995) in oblakih (Fuzzi et al., 1997; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005). Burrows (2009) je izračunal, da 1 m<sup>3</sup> zraka nad oceani vsebuje približno 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> mikroorganizmov, na kopnem pa je koncentracija vsaj 10 krat manjša. V oblakih pa naj bi po izračunih obstajala koncentracija od 10<sup>3</sup> do 10<sup>5</sup> celic/mL vode v oblakih (Sattler et al., 2001; Bauer et al., 2002; Amato et al., 2005).

Koncentracije bakterij v zraku so najvišje v pasu pri površju zemlje, te se premikajo na krajše razdalje do nekaj kilometrov. Številne bakterije in spore gliv so bile najdene na višini med 1 in 7 km nad površjem (Gregory, 1961), kot npr. nad Južnim oceanom pri Antarktiki, kjer so bile najdene bakterije v aerosolih 5,4 km visoko (Pearce et al., 2009). Pojavljanje različnih vrst bakterij v različnih vertikalnih atmosferskih slojih bi lahko bila posledica temperaturnih mej ter tankih puferskih con (oz. pavz), kot npr. tropopavze (Pearce et al., 2009). Oportunistični patogeni vrsti *Staphylococcus pasteurii* in *Bacillus simplex* sta bili najdeni na višini kar 41 km (Wainwright et al., 2003). Rekordna višina, kjer so bile bakterije s pomočjo raket najdene v stratosferi, je bila 70 km nad površjem Zemlje (Imshenetski et al., 1978). Sevi, ki lahko preidejo v višine nad pasom pri površju zemlje (nad 1 km), se lahko premikajo najdlje, tudi med kontinenti.

Višina pojavljanja bakterij v atmosferi vpliva na sestavo spor, tako da naj bi obstajali posebni »alpinski tipi« mikroflora v atmosferi (Ebner et al., 1989). Tako npr. *Cryobacterium psychrophilum* v svoji membrani vsebuje veliko 12-metil pentadekanojske kisline, kar najverjetneje omogoča fluidnost membrane tudi pri nizkih temperaturah (Suzuki et al., 1997). Najverjetneje so v evolucijski zgodovini mikroorganizmov prilagoditve na pogoje v atmosferi vplivale na populacijsko genetiko mikrobov ter njihov genom (Morris et al., 2011).

Sezonsko in dnevno variiranje količin mikroorganizmov v zraku ima velik pomen, saj vpliva na življenjske cikle višjih organizmov, predvsem v primeru delovanja patogenov. Za koncentracijo mikroorganizmov v zraku je bilo opisano, da kaže dnevno in sezonsko variabilnost v odvisnosti od meteoroloških pogojev (Lighthart in Shaffer, 1995) oziroma številnih fizikalnih parametrov, kot na primer nivoja zračne vlage in temperature, hitrosti vetra (Huang et al., 2002; Lighthart in Shaffer, 1995) ter zračnega tlaka (Stennet in Beggs, 2004). Ti dejavniki so seveda tesno povezani s topografijo in z dnevnim ter letnim cikličnim sončnim obsevanjem površja (Lighthart, 1999; Hasnain et al., 2005; Rossi et al., 2005). Človek s svojimi vplivi prispeva k tvorbi mikroklima (Lighthart, 1999), s kmetijsko rabo tal pa tudi na pojavnost spor in dnevnih koncentracij v zraku (Calderon et al., 1997; Kasprzyk in Worek, 2006). Najvišje vrednosti se pojavljajo med poletjem, a do določene mere tudi jeseni in spomladi (Pearce et al., 2009). V področjih z milim podnebjem ima na te vrednosti velik vpliv predvsem dejstvo, da so listne ploskve rastlin pomemben vir bakterij (Tong in Lighthart, 2000) in gliv (Levetin in Dorsey, 2006; Mitakakis et al., 2001) v zraku. Bakterije, ki se v zraku nahajajo v spomladanskem času, bi lahko bile bolj občutljive oziroma bolj ekstremno izpostavljene okoljskim stresom (stradanje, sonce itd.) in aerosolizaciji, posledično bi pričakovali tudi manj kultivabilnih bakterij na delec (Tong in Lighthart, 2000). Amato et al. (2007a) je pokazal, da se v poletnih mesecih, ko je izpostavljenost močni svetlobi večja, favorizirajo po Gramu negativne bakterije, ki so odpornejše na poškodbe UV žarkov.

## **2.2 Prilagoditve bakterij na pogoje v zraku**

Atmosfera tako predstavlja bakterijam ekstremno okolje z variabilnimi meteorološkimi dejavniki, ki določajo čas, ki ga bodo preživele v atmosferi. Prevladujoči in dobro poznani vplivi so hitrost in smer vetra, sončno sevanje, izsuševanje celic zavisi od temperature, relativne vlažnosti, dežja ter konvekcije (Flechtner, 1999; Van Thielen and Garbary, 1999; Garty, 1999; Hughes, 2003; Elster and Benson, 2004; Jones in Harrison, 2004; Pearce et al., 2009; Amato et al., 2007a). Koncentracije nutrientov so v atmosferi nizke, zato se predvideva, da celice potrebujejo posebne fiziološke prilagoditve, da v takem okolju ostanejo žive (Amato et al., 2007a). Metagenomske analize so pokazale, da se pri zračni



mikroflori pogosteje pojavljajo specifični geni za odpornost na izsuševanje in na poškodbe, ki jih povzroča kisik (Tringe et al., 2008). Spet druga prilagoditev je sinteza pigmentov, ki celice ščitijo pred veliko izpostavljenostjo UV žarkom (Imshenetsky et al., 1978, Christner et al., 2000). Kot sintetizatorji pigmentov za zaščito pred sevanjem so dobro znani pripadniki razreda *Actinobacteria* (González-Toril et al., 2009). Rumeno do oranžno pigmentirane bakterije pogosto prihajajo iz hladnih okolij (Fong et al., 2001; Foght et al., 2004).

Z vprašanjem, ali bi se celice v aerosolih (oblakih) lahko razmnoževale, se je prvi ukvarjal Dimmick s sod. (1979), ki je ugotovil, da so se bakterije razmnoževale na zračnih delcih iz  $7.3 \times 10^5$  na  $1.4 \times 10^6$  celic/L v šestih urah. Do podobnih ugotovitev je prišel Amato s sod. (2007a), kjer so mikrobne troposferske populacije izolirane v oblakih, vsebovale do  $8 \times 10^4$  bakterij/mL vode v oblakih in so se bile sposobne razmnoževati pri nizkih temperaturah (et al., 2007a).

Bakterije so v zraku lahko prisotne v oblakih, v megli, potujejo lahko proste ali vezane na druge trdne (mineralne) delce, na prah, pelod, spore gliv, organske delce ali celo na točo (Mandrioli et al., 1973; Lighthart 1997). Tiste iz vodnih aerosolov oblakov, v primerjavi s prostim potovanjem po zraku, tam najdejo drugačne, mogoče celo rahlo milejše pogoje. Na primer sončno sevanje na visokih višinah lahko močno inhibira mikrobno aktivnost, a oblaki lahko zagotovijo senco pred škodljivim in baktericidnim UV žarčenjem (Pearce et al., 2009). Pritrjenost na anorganske prašne delce, ki jim nudijo boljšo zaščito pred UV žarki, prav tako povečuje njihovo viabilnost v atmosferi (Pearce et al., 2009). Predpostavlja se, da tekoča in superhladna voda, ki sestavlja troposferske oblake, predstavlja boljši začasni habitat za žive celice v zraku kot pa suh zrak, saj je izsuševanje limitirajoč dejavnik za rast (Amato et al., 2007a). Nasprotno pa ima voda v oblakih lahko visoko oksidativno kapaciteto, prisotne so lahko toksične snovi, kot npr. formaldehid, relativno nizke temperature ter kisel pH (3-7) (Amato et al., 2007a), kar ima lahko vpliv na abundanco in tipe prisotne mikroflora (Morris et al., 2011). V oblakih bo kisel pH favoriziral prisotnost gliv ter bakterij, ki tvorijo spore, a nevtralen pH bo favoriziral prisotnost večje raznovrstnosti mikroorganizmov (Amato et al., 2005).

V atmosferi torej potekajo fizikalno-kemijske reakcije, ki vplivajo na življenjsko dobo bakterij oz. njihovo celokupno maso, količino svetlobe, ki jo oddajo in vsrkajo, sposobnost proizvodnje atmosferskih oksidantov, ter sposobnost, da delujejo kot kondenzacijska jedra za tvorbo oblakov in ledenih kristalov (Morris et al., 2011). Superhladna voda namreč potrebuje zamrzovalno površino in to lahko ponudijo mineralni delci, bioaerosoli ali mikrobne celice (Pearce et al., 2009), ki merijo od nekaj 10 nm pa do milimeterskih velikosti (Jaenicke 2005). *Pseudomonas syringae* ima zelo učinkovito sposobnost tvorjenja jeder iz ledenih kristalov (Cochet in Widehem, 2000), kar nakazuje, da bi lahko tvorila ledene kristale v superhladnih oblakih pri relativno visokih temperaturah, za kar ima poseben gen, ki kodira IN protein (»Ice nucleation protein«) (Pearce et al., 2009). Protein je nameščen na površju zunanje membrane in služi kot podlaga za ureditev vodnih molekul za tvorbo ledu. Obstajajo pozitivne in negativne strani te lastnosti, saj bi manj proteina podaljšalo življenjsko dobo oblakov in s tem pospeševalo razširjanje bakterij, a hkrati bi več aktivnosti vodilo k hitrejši precipitaciji (Pearce et al., 2009). Obilje bakterij v atmosferi bi lahko pomembno prispevalo k sposobnosti kondenzacije oblakov in na sam pojav oblačnosti (Ariya in Amyot, 2004). Aktivno delovanje v vlogi tvorbe kondenzacijskih jeder lahko vodi v precipitacijo (Ariya in Amyot, 2004; Morris et al., 2004; Szyrmer in Zawadzki, 1997). Morris in sod. (2008) so dokazali, da so sevi, izolirani iz snega in dežja, delovali kot zamrzovalna jedra pri temperaturah med  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Številne raziskave nakazujejo tudi na možnost razmnoževanja v kapljicah oblakov, tudi pri temperaturah blizu  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Dimmick et al., 1979, Fuzzi et al., 1997 in Sattler et al., 2001). Hladna atmosfera na visokih višinah je bila smatrana kot neprimeren prostor za rast bakterij, dokler ni bilo ugotovljeno, da bakterije lahko rastejo ter metabolizirajo v superhladnih kapljicah v oblakih (Sattler et al., 2001). Na razmnoževanje pa naj bi imel vpliv tudi  $\text{CO}_2$ . Merjene dnevne koncentracije bakterij v zraku so pokazale njihovo porast ob povišanih dnevnih koncentracijah  $\text{CO}_2$ , kar naj bi povzročalo povišano produkcijo spor na substratih (Klironomos et al., 1997).

Mehanizmi, ki omogočajo, da mikrobi preživijo v atmosferi, od njih zahtevajo aktivno metabolno delovanje (Morris et al., 2008), torej bi bakterije lahko imele vlogo pri kemijski sestavi atmosfere (Ariya et al., 2002; Ariya in Amyot, 2004; Amato et al., 2007a). K temu prispevajo tudi dogodki, kot na primer desorpcija molekul iz bioloških površin (Cote et al.,

2008), izpust snovi zaradi celične lize ter trki in združevanje delcev (Morris et al., 2011). Atmosfera je torej tudi habitat, kjer poteka interakcija med bakterijami in okoljem, ki jih obdaja. Troposferske bakterijske populacije, izolirane iz oblakov, so sposobne metabolizirati glavne organske kisline v vodi oblakov in situ, npr. format, acetat, laktat in tako lahko vplivajo na kemijo oblakov (Pearce et al., 2009). Lahko pa imajo tudi encime za pretvarjanje formaldehida in metanola, ki sta prisotna v relativno visokih koncentracijah (Suzuki et al., 1998). Vloga bakterij v zraku kot potencialnega vira oz. ponora acetona ter drugih organskih snovi v atmosferi predstavlja zanimivo neznanko v meteorološki mikrobiologiji z navezavo na klimo in vreme (Amato et al., 2007a). V kolikšni meri bakterijski procesi vplivajo na pretvarjanje organskih in anorganskih komponent v atmosferi še vedno ni znano, a najverjetneje tega ni za zanemarjati ob predpostavki, da bakterije rastejo in se delijo, porabljajo kisik ter sintetizirajo beljakovine in množico metabolitov v atmosferi nad ali pod 0 °C (Sattler et al., 2001). Sposobnost spreminjati vsebnost organskih snovi v kapljicah v oblakih zavisi od dostopnosti hranil, temperature ter količine vode, ki je največkrat v obliki superhladne vode (Pearce et al., 2009).

V zraku so pokazali prisotnost tako po Gramu pozitivnih kakor negativnih bakterij. Gram pozitivne bakterije prevladujejo v vodi oblakov (Amato et al., 2006). Shaffer & Lighthart (1997) sta ugotovila, da v suhem zraku 80 % kultivabilne populacije pripada Gram pozitivnim bakterijam, medtem ko je Heidelberg et al., (1997) pokazal, da Gram negativne bakterije izgubijo kultivabilnost ob aerosolizaciji. Amato et al. (2006) so med 61 identificiranimi izolati iz vode oblakov dobili 37 pripadnikov Gram pozitivnih (61 %) ter 24 Gram negativnih (39 %). Gram negativni sevi so mnogo bolj uspešni pri rasti pri nizkih temperaturah, saj ima to zmožnost 75 % testiranih sevov (Amato et al., 2006). Na polih ter visokih gorstvih so dominantnejše Gram negativne bakterije (Alfreider et al., 1996; Brinkmeyer et al., 2003; Groudieva et al., 2004).

### **2.3 Mikroorganizmi in pojav aerosolizacije**

Pojav aerosolizacije pomeni prenos mikroorganizma iz tekoče oz. trdne faze v plinasto (Moletta et al., 2010). Do danes ni znano, ali je aerosolizacija naključen pojav ali pa imajo nekateri mikroorganizmi intrinzične sposobnosti, da se bodisi izogibajo bodisi pospešujejo

svoj vstop v zračni prostor. Nekatere raziskave nakazujejo, da aerosolizacija ni naključen pojav, kar bi lahko pomenilo, da je to eden izmed mehanizmov, ki jim omogoča potovanje na zelo velike razdalje, ter bi lahko bil vzrok za kozmopolitsko pojavljanje nekaterih bakterij (Pearce et al., 2009), tudi patogenih (Morris et al., 2007). Hamilton in Lenton (1998) sta predlagala, da mikroorganizmi v atmosferi lahko uporabljajo kemijsko indukcijo kondenzacije vode, da si omogočijo oz. povečajo možnost za razširjanje z vetrom med vodnim in kopenskim okoljem oz. epifiti, kjer so sposobni rasti. Na morju aerosoli, ki vsebujejo mikroorganizme (Leck in Bigg, 2005), nastajajo kot posledica pokanja mehurčkov, ki iz globine potujejo na površje skozi površinski mikrosloj. Ti so glavni vektor za transport bakterij in virusov po zraku nad morsko gladino (Aller et al., 2005), kar lahko vodi v prisotnost bioloških delcev v atmosferi odmaknjenih območjih, kot na primer nad centralnim Arktičnim oceanom (Leck in Bigg, 2005). V primeru glivnih spor lahko pride do razširjanja rastlinskih boleznih tudi med kontinenti (Pearce et al., 2009). Z molekularnimi metodami so pokazali dobro aerosolizacijsko sposobnost bakterije *Mycobacterium* sp. (Angenent et al., 2005). Sicer pa je razen za aktivne mehanizme glivnih spor iz konidiofor oz. turgidnih askov (Jones in Harrison, 2004) o mehanizmih vstopanja v zrak, posebej glede bakterij, zelo malo znanega (Morris et al. 2008, 2011; Moletta et al., 2010), sploh pa kateri mikrobi zrak uporabljajo kot vektor za razširjanje (Moletta et al., 2010).

Na kopnem so glavni vir mikroorganizmov v zraku površinski deli rastlin, ki jih s površin odnaša veter oz. lahko v zrak vstopijo kot posledica premikov rastlin, bodisi ker rastline premika veter, bodisi drugi dejavniki, npr. živali (Lighthart, 1997). Sušenje površin listov kot posledica bioloških procesov ali spreminjajočih se razmer v atmosferi lahko pospešuje proces vstopanja mikroorganizmov v zračni prostor (Morris et al., 2011). Na povečano zmožnost aerosolizacije pa bi tudi ob mirnem ozračju lahko vplivala tudi prekomerna mikrobna rast, ki bi povzročila presežek fizikalne nosilne kapacitete rastlinskih površin (Morris et al., 2011). Te mehanizme bi lahko pospeševal ali pa zaviral tudi naboj na listni površini, ki bi uravnaval privlak ali pa odboj mikroorganizmov (Leach, 1987). Dejavniki, kot npr. velikost in oblika celice, hidrofobnost membrane, lahko povečujejo možnost aerosolizacije mikroorganizma takrat, ko pride v stik z zrakom (Moletta et al., 2010). Povečana hidrofobnost membrane bi lahko spremenila afiniteto mikroorganizmov do vode

in tako olajšala možnost »vzleta« (Moletta et al., 2010). Nekateri pigmenti, kot npr. prodigiosin, najden v vrsti *Serratia marcescens*, povišujejo hidrofobnost celične membrane, kar spodbuja aerosolizacijo (Burger and Bennett, 1985). V zrak lahko preidejo tudi vezani na delce, ki jih veter, na primer ob puščavskih nevihtah, prenese v zrak, kar je ugotovil Griffin s sod. (2006). Dnevne koncentracije bakterij ter glivnih spor v zraku na vzorčnih mestih sredi oceana so bile močno povezane z dnevnimi koncentracijami prašnih delcev v puščavi. Nad Amazonijo kar 74 % mase aerosolov sestavljajo biogeni delci, v svetovnem merilu pa predstavljajo 20 % celotne mase aerosolov (Morris et al., 2011).

### 2.3.1 Razširjanje v atmosferi

Mikroorganizmi lahko potujejo kot priskledniki na mineralnih delcih, prahu, pelodu, sporah gliv, organskih delcih ali celo toči (Mandrioli et al., 1973; Lighthart 1997). Razširjanje bakterij, alg, gliv in tudi večjih organizmov na dolge razdalje s pomočjo kroženj v atmosferi, oceanskih tokov, ptic, rib, sesalcev in človeka je poznano že od sredine 20. stoletja (Gislen, 1948; Gregory, 1967; Schnell in Vali 1972; Marshall, 1996a, b; Vincent, 2000), a vseeno je o tem fenomenu zelo malo poznanega (Pearce et al., 2009; Moletta et al., 2010). Pomembno vlogo pri razširjanju po zraku imajo peščeni viharji (Kellogg in Griffin, 2006), od katerih so tudi močno odvisne dnevne koncentracije bakterij in glivnih spor v zraku na vzorčnih mestih nad oceanom, saj so korelirale z dnevnimi koncentracijami puščavskega prahu v zraku (Griffin et al. 2006). Opazovanja skupkov, ki vsebujejo bakterije, včasih prekrte z mukoznimi snovmi (Lighthart, 1997; Leck in Bigg, 2005), podpirajo domnevo, da koščki ostankov mikrobnih biofilmov lahko delujejo kot objekti za letenje bakterij, kjer lahko le-te preživijo oziroma se od tam ločijo (Morris in Monier, 2003). Medhemisferski transport viabilnih gliv in bakterij skupaj s prašnimi delci je bil prikazan v tropih, sledil je meteorološkimi in sezonskim vzorcem (Prospero et al., 2005). Vnos novih neavtohtonih vrst na nova območja je redko posledica le prenosa po zraku in prirojena zmožnost za prenašanje po atmosferi lahko določa potencial invazivnosti za introducirane mikroorganizme (Isard et al., 2005). Na primer, domneva se, da naj bi *Phragmidium violaceum* prišel na Novo Zelandijo preko zračnih tokov ter da so inokuli potrebovali 6 let za prehod preko Tasmanovega morja (McKenzie, 1998). Razširjanje z zračnimi tokovi nam služi kot najboljši model za razlago prisotnosti zelo specifičnih

mikroorganizmov v okoljih, ki so si med seboj zelo različna in oddaljena (González-Toril et al., 2009). Alfreider in sodelavci (1996) so v snegu pri visokogorski alpski postaji našli bakterije, ki so izvirale iz zraka, iz česar so sklepali na veliko vlogo atmosfere pri razširjanju bakterij. Organizmi, ki živijo v toplih in/ali mrzlih kopenskih puščavah, so zelo dovzetni za razširjanje zaradi njihovih posebnih prilagoditev na ekstremno varirajoče pogoje (temperatura, radiacija, spektralna kvaliteta, izsuševanje itd.) (Flechtner, 1999; Van Thielen in Garbary, 1999; Garty, 1999, Elster in Benson, 2004). Majhna velikost mikroorganizmov deluje v prid prenašanju z zračnimi masami. Glede na tip oblakov se zrak in vodne mase premikajo vertikalno ali horizontalno. Kumulonimbusi bi torej lahko bili pomembni pri »pobiranju« celic in transportu v višino, ne pripomorejo pa k horizontalnem transportu oziroma transportu na dolge razdalje. Cirusi, ki se pojavljajo na visokih višinah, lahko potujejo dolge razdalje in lahko preko oceanov nosijo bioaerosole, ki so pomemben vir mikroorganizmov v oblakih (Amato et al., 2007b). Po tem, ko so bakterije prepotovale neko razdaljo v atmosferi ter se s padavinami odložile na površju, lahko vplivajo na sestavo mikrobnih združb v snegu, prsti, jezerski vodi in oceanih, ter na metabolne poti in prehranske splette v tistih okoljih, v odvisnosti od njihove abundance in preživetvenih sposobnosti. Lahko povzročajo ekološke posledice na habitatih, v katerih se deponirajo, sploh če so ti odmaknjeni in neokrnjeni, kot na primer led severnega tečaja ali območja na veliki višini (Pearce et al., 2009). Zelo pogost primer je pojav saharskega peska na snegu v alpskem visokogorju (De Angelis in Gaudichet, 1991). Oblaki lahko s seboj nosijo tudi patogene bakterije, nevarne tudi za ljudi (Amato et al., 2007a).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Metode**

##### **3.1.1 Oris področja raziskave**

Terensko delo je potekalo na dveh slapovih v Zgornjesoški dolini. Prvi slap, Kozjak, se nahaja pri Kobaridu, na nadmorski višini 300 m in je priljubljena turistična točka.

Visok je 15 m ( $46^{\circ}15'41,46''$  N,  $13^{\circ}35'32,92''$  E), obrnjen je proti jugu in zaradi lege globoko v soteski ni nikoli obsijan s soncem. Potok istega imena izvira v več izvirih visoko pod grebeni Oblega brda (1957 m), Krničice (2142 m) in Srednjega vrha (2134 m). Zaradi apnenčaste podlage je na strmejšem terenu voda izdolbla sotesko, v kateri so številni tolmini in slapovi, zato se tu od junija do oktobra izvaja tudi športno-adrenalinska dejavnost soteskanja. Potok se izlije v reko Sočo. Prispevno območje potoka je prisojna planota pod Krnom, kjer so štiri vasi: največji Drežnica in Drežniške Ravne, ter zaselka Magozd in Jezerca. Vseh prebivalcev skupaj je približno 600. Tu se nekateri domačini ukvarjajo z rejo drobnice (cca 300 glav) in govedi (cca 50 glav), zato smo ta slap obravnavali kot organsko obremenjen.

Drugi slap je 50 m visoka Parabola potoka Fratarica, ki se nahaja bolj severno, pri vasi Log pod Mangrtom, na nadmorski višini 760 m ( $46^{\circ}24'6,28''$  N,  $13^{\circ}36'27,53''$  E). Obrnjen je proti severozahodu, sončni žarki v globel posijejo le za eno do dve uri v juliju in avgustu. Izvira izpod ostenja t.i. Loške stene, obrnjene na sever, visoke 1000 metrov. Sestavljajo jo trije glavni vrhovi: Oblica (2240 m), Bricelj (2343 m) ter Bavh (2189 m). Tudi tu se od junija do oktobra izvaja soteskanje, a vseeno smo menili, da ta dejavnost ni vir organskega onesnaženja.



Slika 1: Rdeča krogca na zemljevidu predstavljata lego obeh slapov.

### 3.1.2 Vzorčenje

Opravili smo štiri terenska vzorčenja vode, snega ter zraka (preglednica 1). Zimski čas smo si izbrali zaradi nizkih temperatur ozračja in vode ter nižjega pretoka, spomladanski pa predvsem, ker nas je zanimalo, kakšen vpliv na bakterijsko združbo vode in aerosolov bo imel ob višjem pretoku topeči se sneg (predvsem za Parabolo). Dokazati smo želeli povezanost med bakterijami v snegu, ki napaja slap, in ponovno aerosolizacijo. Tako smo spomladi pričakovali več bakterij v aerosolih, saj naj bi se te zadrževale v več mesecev uležanem snegu, višji pretok pa vpliva na vodnatost slapu, kar tvori več pršenja in posledično predvidoma več aerosolizacije.



**Preglednica 1:** Prikaz vzorčnih mest.

Ime vzorčenega slapu:	Datumi vzorčenj:	Vzorčna mesta:	
		VODA	ZRAK
Kozjak	21. 5. 2009	1. Voda Kozjaka pri Drežnici (Voda Drežnica) (46°15'45,17" N, 13°36'25,27" E)	1. Zrak 20 m od slapu (Zrak 1)
	15. 3. 2010	2. Voda v tolmunu pod slapom (Voda tolmun)	2. Zrak 50 m od slapu (Zrak 2)
Parabola	11. 5. 2009	1. Sneg nad slapom Parabola (Sneg)	1. Zrak 20 m od slapu (Zrak 1)
	21. 2. 2010	2. Voda v tolmunu pod slapom (Voda tolmun)	2. Zrak 50 m od slapu (Zrak 2)



**Slika 2:** Vzorčna mesta pri slapu Kozjak, kjer smo pridobil vzorce »Voda tolmun« (A) ter »Zrak 1« (B). Poleg vzorčevalnika zraka je bila nameščena tudi meteorološka postaja (C), ki je merila zračni tlak, zračno vlago in temperaturo. Smer padca slapu je proti jugovzhodu.



**Slika 3:** Vzorčna mesta pri slapu Parabola, kjer smo pridobili vzorce »Voda tolmun« (A) ter »Zrak 1« (B) in »Zrak 2« (C). Smer padca slapu je proti severozahodu.

Material, uporabljen na terenu:

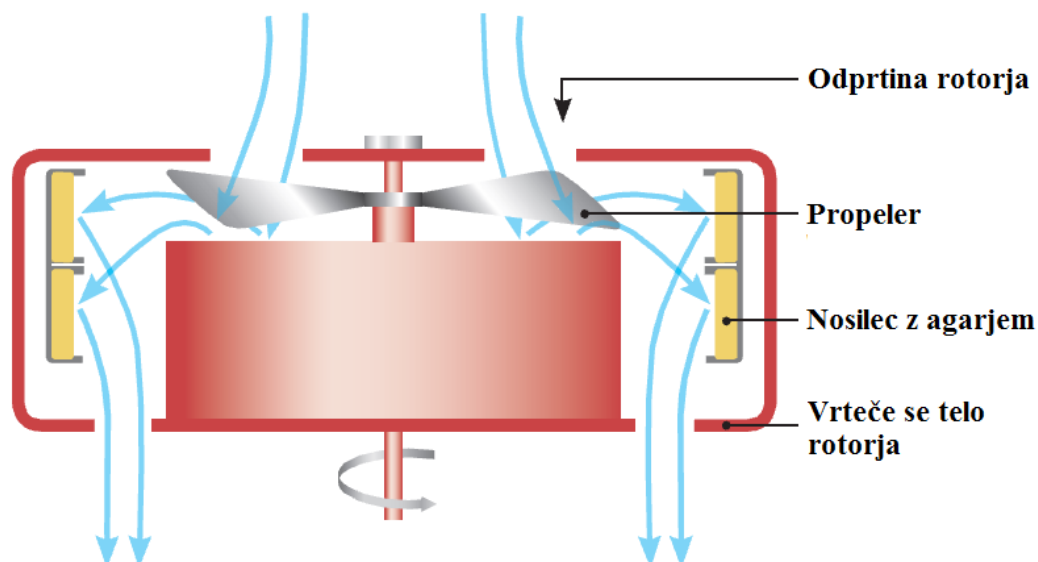
- bencinski generator,
- plastične sterilne posode za vzorčenje vode (Golias, Slovenija),
- sterilne vrečke za vzorčenje snega,
- etanol 70 %,
- RCS vzorčevalnik zraka (2 sterilna rotorja) (Biotest, Nemčija),
- gojišča v plastičnih nosilcih za RCS vzorčevalnik: nutrient agar (NA), R2A agar, 1/100 redčen NA, 1/10 R2A agar. Vsem gojiščem smo dodali cikloheksimid (50 mg/ml) za preprečitev rasti gliv,
- meteorološka postaja (RVM 96C, Ames, Slovenija),
- multimeter za fizikalne meritve Multi 350i/SET (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Nemčija),

- hidrometrično krilo (Efe & GB nets, Velika Britanija).

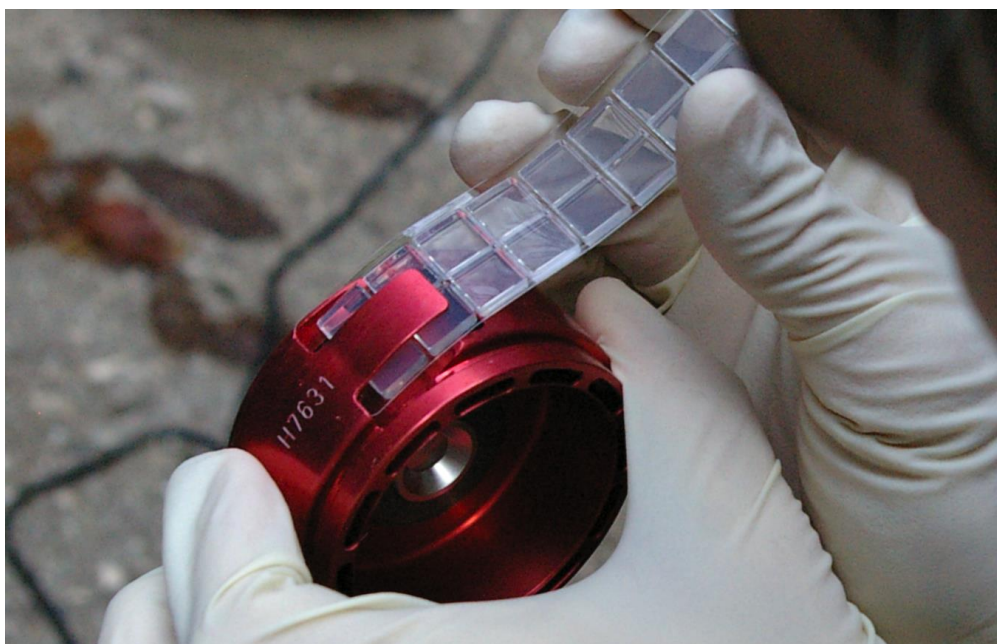
### 3.1.2.1 Mikrobiološko vzorčenje

#### 3.1.2.1.1 Vzorčenje zraka

Vzorčevalnik RCS High Flow je naprava, ki vsebuje rotor z vgrajenim fiksnim propelerjem, kar ob vrtenju povzroča sesanje zraka skozi odprtine rotorja (slika 4). V boben, ki smo ga z magnetom pritrdili na telo RCS, smo vstavili za to posebej oblikovan trakasti plastični nosilec gojišča za bakterije (strip) (slika 5). Na monitorju smo nastavili želeni volumen zraka (500 litrov). Vzorčevalnik smo postavili na želeno mesto in ga prižgali (slika 6). Med vzorčenjem zraka se v bližnji okolici naprave nismo smeli gibati, saj bi to lahko imelo vpliv na sestavo bakterij v zraku. Na vsakem vzorčnem mestu smo vzorčili po 3 paralelke za štiri različne tipe gojišč (NA, 1/100 NA, R2A, 1/10 R2A). Ob prihodu v laboratorij smo gojišča inkubirali v temi na sobni temperaturi do 3 tedne.



**Slika 4:** Ob vrtenju rotorja in rezila se skozi odprtine na obeh koncih bobna sesa zrak in tako enakomerno porazdeljuje aerosole na strip (Vir: Navodila za uporabnike: RCS High Flow Touch, Biotest, Nemčija).



**Slika 5:** V rdeči vrtljivi boben, ki se z magnetom pritrdi na vzorčevalnik zraka RCS High Flow, se na terenu vstavi plastični strip, na katerem je medij za vzorčenje.



**Slika 6:** RCS High Flow (na mizici) ter meteorološka postaja za vzorčenje fizikalnih parametrov atmosfere.

### **3.1.2.1.2 Voda**

Vodo smo vzorčili z zajetjem v sterilne plastične posode in jo shranili v hladilni torbi. Takoj po prihodu v laboratorij smo vzorce iz različnih vzorčnih mest nacepili na 3 paralelke za vsak tip gojišča v petrijevki v dveh volumskih kategorijah; 50 ml ter 100 ml. Zunanji rob petrijevk smo oblepili s trakom, tako smo preprečili izsuševanje gojišča. Vse nacepljene vzorce smo shranili na sobni temperaturi. Uporabili smo enaka gojišča kakor pri vzorčenju zraka (NA, 1/100 NA, R2A, 1/10 R2A).

### **3.1.2.1.3 Sneg**

Sneg, ki je ležal ob strugi nad Parabolo smo vzorčili v sterilizirane plastične vrečke, ki smo jih shranili v hladilni torbi. Ob prihodu v laboratorij smo stopljen sneg nacepili po istem postopku kot pri vzorcih vode.

### **3.1.2.2 Fizikalne meritve**

Med vzorčenjem smo izmerili pretok vode, temperaturo vode, pH, nasičenost vode s kisikom, prevodnost, temperaturo zraka, relativno vlago ter zračni tlak.

### **Merjenje hitrosti pretoka vode**

Izračun pretoka je na osnovi produkta izmerjene hitrosti in površine prečnega prereza struge. Meritve globine v preseku struge smo uporabili za izračun približne površine prečnega prereza.

1. Izmerili smo globino struge na različnih oddaljenostih od brega.
2. Na istih točkah smo s hidrometričnim krilom (Efe & GB nets, Velika Britanija) izmerili hitrost vode na 6/10 globine vode.

3. Izračunali smo delne površine prečnega prereza po enačbi:

$$a_n = g_n \times (r_{n+1} - r_{n-1})/2 \quad \dots (1)$$

$a_n$  – površina n-tega dela prečnega prereza struge ( $m^2$ ),

$r_n$  – oddaljenost vzorčne točke »n« (m),

$g_n$  – globina vode na vzorčni točki »n« (m).

4. Izračunali smo delne pretoke po enačbah:

$$Q_n = a_n \times V_{pov(n)}, n = 1,2,3,4\dots \quad \dots (2)$$

$Q_n$  – pretok skozi n-ti del prečnega prereza ( $m^3/s$ )

$V_{pov(n)}$  – povprečna hitrost vodnega toka na vzorčni točki »n« (m/s)

5. Izračunali smo skupni pretok po enačbi:

$$Q_t = Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4 + \dots + Q_{(n-r)} + Q_n \quad \dots (3)$$

$Q_t$  – skupni pretok ( $m^3/s$ ).

### **Temperatura vode**

Sondo prižganega multimetra Multi 350i/SET (WTW, Nemčija) smo za približno 10 cm potopili v vodo ter po približno 30 s zabeležili izmerjeno temperaturo.

### **Elektroprevodnost vode**

Odvisna je od temperature raztopine in koncentracije ionov v raztopini ter njihovih značilnosti:

- stopnje disociiranosti snovi v ione,
- električnega naboja posameznih ionov in
- mobilnosti ionov.

Bolj kot je vodno telo obremenjeno s hranili, tem višja je prevodnost, saj se z dotokom hranil praviloma poveča količina nabitih delcev. Vrednosti smo izmerili po istem postopku kot pri merjenju temperature vode.

### **Parametri zraka**

Meteorološko postajo (RVM 96C, Ames, Slovenija), ki je merila zračni tlak in temperaturo, smo pri obeh slapovih imeli nameščeno na oddaljenosti približno 30 m od slapu. Izmerjene vrednosti so se v minutnem časovnem intervalu beležile na spominsko kartico, iz katere smo kasneje pridobili podatke.

#### **3.1.2.3 Kemijske meritve**

##### **Nasičenost s kisikom**

Nasičenost vode s kisikom je odvisna od temperature, zračnega tlaka in koncentracije ionov. 100 % nasičenost pomeni najvišjo možno nasičenost vode ob danem zračnem tlaku in temperaturi.

Sondo prižganega multimetra smo za približno 10 cm potopili v vodo ter z njo počasi krožili po vodi. Mešanje je potrebno zaradi morebitnih napak meritev, ki bi jih lahko povzročili majhni mehurčki, nabrani na membrani sonde. Ko se je spreminjanje vrednosti na monitorju multimetra umirilo, smo to zabeležili.

##### **pH**

Sondo prižganega multimetra smo za približno 10 cm potopili v vodo ter po približno 30 s zabeležili izmerjen pH.

##### **Koncentracija nitratov**

Določanje nitratnih ionov se mora začeti takoj po odvzemu vode. V našem primeru to ni bilo mogoče, zato smo vzorce vode hranili v hladilni posodi, s temperaturo blizu 0 °C.



Material:

- čaše, volumna 100 ml (dve za vsak vzorec in ena za umerjanje spektrofotometra),
- merilna buča, volumna 100 ml,
- merilna buča, volumna 1000 ml,
- sušilnik,
- steklene ali polietilenske posode, volumna 1 l,
- merilni valj, volumna 100 ml,
- pipete in nastavki za pipetiranje,
- stekleni filter,
- spektrofotometer.

Reagenti:

- raztopina natrijevega salicilata ( $C_7H_5NaO_3$ ),
- žveplova (VI) kislina ( $H_2SO_4$ ),
- natrijev hidroksid (NaOH),
- kalij-natrijev tartrat ( $C_4H_4KNaO_6 \times 6H_2O$ ),
- destilirana voda.

Izvedba:

## 1. Teren:

- posodo smo na mestu vzorčenja sprali z vzorčevalno vodo,
- posodo smo napolnili do vrha z vzorcem vode.

## 2. Laboratorij:

delo v laboratoriju smo opravili po postopkih, opisanih v skripti Varstvo celinskih voda (Urbanič in Toman, 2002).

## **Koncentracija fosfatov**

### Material:

- Čaše, volumna 100 ml (dve za vsak vzorec in ena za umerjanje spektrofotometra),
- merilni buči, volumnov 100 ml in 1000 ml,
- sušilnik,
- vzorčevalne posode, volumna 1 l,
- merilni valj, volumna 100 ml,
- kapalka,
- spektrofotometer.

### Reagenti:

- raztopina amonmolibdata,
- raztopina kositrovega (II) klorida v glicerolu.

### Izvedba:

#### 1. Laboratorij

Uporabimo preostanek iste vode, ki smo jo na terenu povzorčili za ugotavljanje koncentracije nitratov. Nadaljnje postopke smo opravili po navodilih, opisanih v skripti Varstvo celinskih voda (Urbanič in Toman, 2002).

## **3.2 Materiali**

### **3.2.1 Priprava gojišč**

#### **3.2.1.1 Priprava gojišč v petrijevkah za vzorce vode in snega**

V merilni bučki smo zamešali:

1. R2A agar: 4,53 g R2A praška (Sigma-Aldrich) + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 200 µg cikloheksimid (cx) (Sigma-Aldrich);

2. 1/10 R2A agar: 0,453 g R2A praška + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 3,75 g čistega agarja + 200 µg cx;
3. nutrient agar (NA) (Sigma-Aldrich): 7 g NA praška + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 200 µg cx;
4. 1/100 NA: 0,07 g NA praška + 250 ml dH<sub>2</sub>O + 200 µg cx;

250 ml dH<sub>2</sub>O je zadostovalo za približno 12 gojišč v petrijevkah. Cikloheksimid je fungicid, raztopljen v dimetilsulfoksidu in smo ga dodali v gojišče, za preprečevanje rasti gliv. Koncentracija v gojišču je bila 50 µg/ml.

### 3.2.1.2 Priprava gojišč v stripih za vzorce zraka

Hranilne agarje smo pripravili po enakem postopku kot pri gojiščih v petrijevkah. Na posamezen strip smo ob gorilniku vlili približno 8 ml tekočega gojišča. 250 ml dH<sub>2</sub>O je zadostovalo za približno 32 gojišč v stripih.

### 3.2.2 Štetje CFU in precepljanje kolonij

Uporabili smo tako vzorce, kjer smo na posamezno gojišče nacepili po 100 µl vzorčene vode oziroma vode iz staljenega snega, kot tudi 50 µl. Uporabili smo tiste vrednosti, kjer smo dobili vrednosti CFU med 30 in 300, kar se običajno uporablja kot standard za ustrezno količino nacepljenega materiala. Odstopanja pri vsakem stolpcu pomenijo standardno deviacijo iz vseh treh paralelk. Kolonije smo preštevali po 3x, z vmesnim razmakom približno 7 dni. Po končani inkubaciji smo iz števila prešteti kolonij, volumna zraka, vode ali snega izračunali povprečje CFU/m<sup>3</sup> (v primeru zraka) in CFU/mL (v primeru snega in vode).

Po gojitvi bakterij na sobni temperaturi smo kolonije ob ognju z ezo precepljali na nova trdna gojišča. Na osnovi DGGE metode, ki je bila predhodno opravljena s strani drugih raziskovalcev na inštitutu, smo določili, da bi bilo cca 10 % zraslih kolonij dovolj za zajetje vseh različnih bakterij, zraslih na ploščah v spomladanskem vzorčenju. Pri zimskem vzorčenju smo zaradi manjšega števila zraslih kolonij precepili od 27 % do 100 % vseh kolonij.

Po precepljanju smo gojišča inkubirali na sobni temperaturi. Po nekaj dneh, ko so na gojiščih zrasle kolonije, smo iz posameznih izolatov izolirali DNK.

Izolacijo DNK iz izolatov DNK smo izolirali z Ezextract DNK kitom (Sekvenator d.o.o., Slovenija) po navodilih proizvajalca. Tako pripravljeno DNK izolatov smo shranili v zamrzovalni skrinji na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za karakterizacijo dobljenih izolatov smo pomnožili gen za 16S rRNK. Uporabili smo oligonukleotidna začetnika 27f in 1495r. Poleg vzorcev smo vsakič naredili še pozitivno (genomska DNK *Escherichia coli*) in negativno kontrolo (samo kemikalije).

Priprava PCR mešanice za 16S rRNK za oligonukleotidna začetnika 27f in 1495r:

**Preglednica 2:** Sestavine za pripravo PCR mešanice.

Kemikalija	Volumen za 1x reakcijo
Voda (MiliQ)	37,7 $\mu\text{l}$
10x pufer	5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu\text{l}$
Oligonukleotidni začetnik 27f (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
Oligonukleotidni začetnik 1495r (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{l}$
dNTP mešanica 40 mM	2 $\mu\text{l}$
AmpliTaq DNA Polymerase 250 U s 5 U/ $\mu\text{l}$ (Applied biosystems, Roche)	0,3 $\mu\text{l}$

Uporabljeni oligonukleotidni začetniki:

27f            5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1495r        5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'G.

Za posamezno PCR reakcijo smo uporabili 49  $\mu$ l mešanice + 1  $\mu$ l izolirane DNK.

Uspešnost PCR reakcije smo pregledali z gelsko elektroforezo.

### **3.2.4 Gelska elektroforeza**

#### **3.2.4.1 Priprava 50 ml gela iz 1 % agaroze**

1. 0,5 g agaroze smo stresli v bučko;
2. dodali smo 50 ml TBE pufra;
3. vsebino smo v mikrovalovki najprej 2 min segrevali do vrelišča, nato pa dodali 10 ml dH<sub>2</sub>O zaradi izhlapevanja;
4. dobro smo premešali in počakali 10 min, da se je raztopina ohladila;
5. raztopino smo vlili v modelček, kjer je nastal gel za elektroforezo.

#### **3.2.4.2 Priprava mešanice za elektroforezo**

Prva luknjica: Marker:  $\lambda$ /IPst 5  $\mu$ l (Fermentas) + SybrGreen II 1,5  $\mu$ l (Fluka).

Druga luknjica: Kontrola: prazno.

Ostale luknjice: Vzorec: 5  $\mu$ l s PCR pomnoženega vzorca + 6x loading dye 1,5  $\mu$ l + SybrGreen 1,5  $\mu$ l.

Napetost nastavimo na 100V, pogledamo, ali se delajo v gelu mehurčki, ter pokrijemo z aluminijasto folijo.

Po 15 minutah smo gel postavili pod UV luč in preverili, ali so se videli pasovi PCR pomnožkov, kar je potrdilo uspešno reakcijo PCR. Ostale vzorce je nato bilo potrebno v sterilni komori iz epic prepipetirati v ploščo 8 x 12. Tako pripravljene plošče smo poslali na sekveniranje (Macrogen, Nizozemska).

### 3.1.3.6 Obdelava rezultatov sekvenciranja

Rezultate sekvenciranja smo dobili v obliki kromatogramov, po eno datoteko za vsak vzorec. Kromatograme smo analizirali s programom FinchTV. Tu se nam je v horizontalni skali pokazalo nukleotidno zaporedje, za vsak nukleotid pa v vertikalni skali še jakost signala (slika 7). Označili smo odsek z najvišjimi jakostmi zaporedij in jasno ločenimi signali za vsako posamezno bazo, odsekov s šibkimi signali ali nedefiniranimi bazami nismo upoštevali. To nukleotidno zaporedje smo shranili v formatu FASTA. Dobljene sekvence smo primerjali z bazo podatkov RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>) in pri nadaljnji opredelitvi sorodnosti in uvrstitvi upoštevali prvih 5 najbolj podobnih zadetkov. Vse sekvence in 5 sorodnikov smo poravnali v programu ClustalX in poravnane sekvence vstavili v program Mega 4, s katerim smo izračunali evolucijske razdalje po Kimurini dvoparametrični metodi. Drevo smo izrisali z algoritmom združevanja sosedov, statistično relevantnost razcepišča smo preverili z metodo bootstrap s 1000 ponovitvami. Bogatost bakterijskih skupin smo ocenili z izračunom indeksa Chao1, po formuli

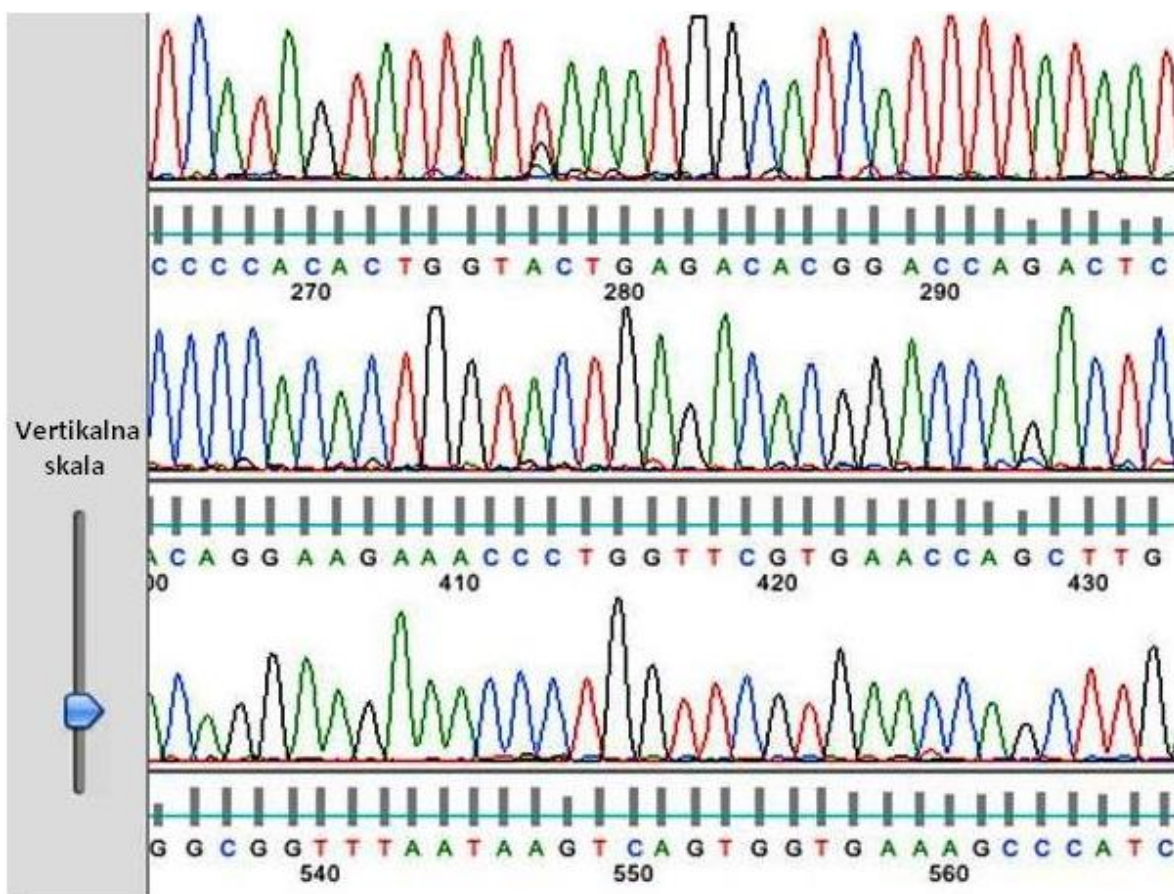
$$S_{CHAO1} = S_{OBS} + n_1(n_1 - 1) / (2(n_2 + 1)) \quad \dots (4)$$

pri čemer je

$S_{OBS}$  - skupno število različnih bakterijskih rodov,

$n_1$  - število rodov, kjer je bil 1 izolat,

$n_2$  - število rodov, kjer sta bila 2 izolata.

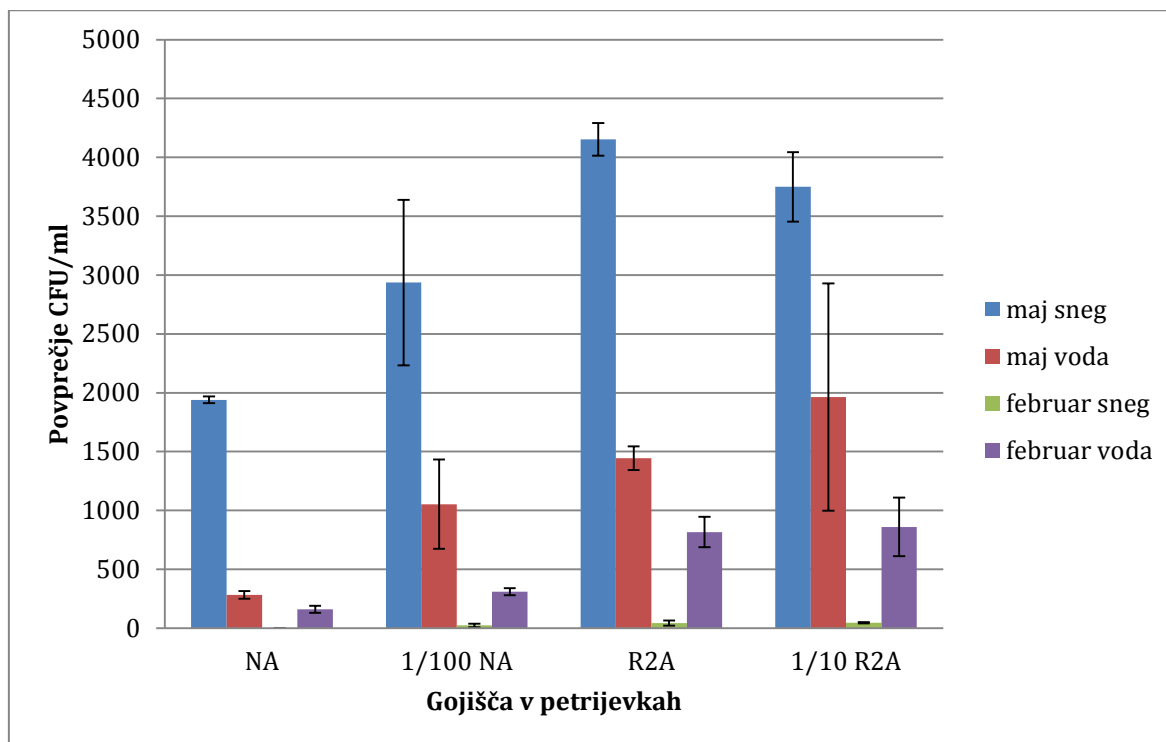


Slika 7: Primer kromatograma nukleotidnega zaporedja.

## 4 REZULTATI

### 4.1 Mikrobiološke analize

#### 4.1.1 Rezultati štetja CFU

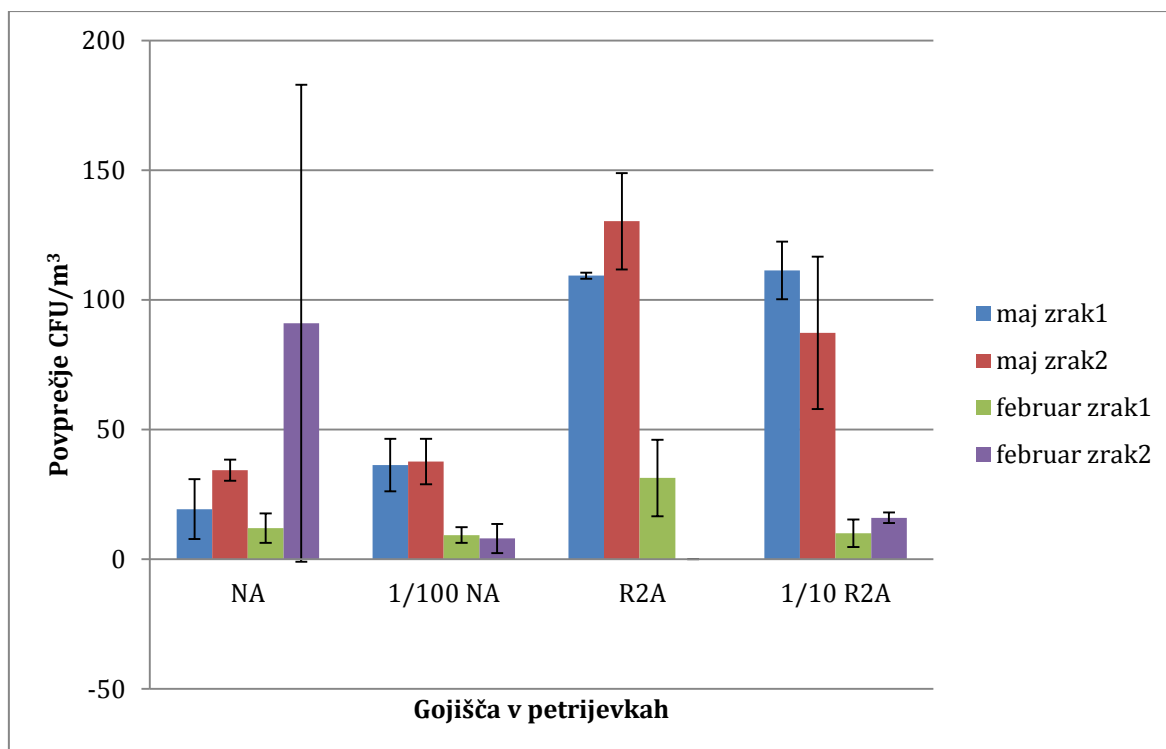


**Slika 8:** Stolpčni diagram povprečnih vrednosti CFU/ml za vzorce vode in snega pri Paraboli, pridobljene maja 2009 in februarja 2010.

S pomočjo Studentovega t-testa smo ugotavljali, ali se diagrami, ki smo jih primerjali, med seboj zanesljivo razlikujejo. Kritična meja zaupanja je vrednost  $p = 0,05$ , kar pomeni, da je 5 % možnosti, da med dvema povprečji (v našem primeru med dvema stolpcema) ni nobene razlike. Če je vrednost  $p < 0,05$ , to pomeni, da med stolpcema obstaja zanesljiva razlika. Vrednosti CFU/ml vzorcev majskega snega so pri vseh štirih gojiščih do 100 krat višje v primerjavi s februarjskim snegom ( $p_{1/100\text{ NA}} = 0,02$ ,  $p_{\text{R2A}} = 0$ ,  $p_{1/10\text{ R2A}} = 0,002$ ). T-test za gojišče NA tega sicer ne potrjuje ( $p_{\text{NA}} = 0,18$ ), saj na tem gojišču februarja ni zrasla niti ena kolonija. R2A ima od NA za 53 % ( $p = 0,046$ ) višje vrednosti CFU/ml, 1/10 R2A pa za 48 % ( $p = 0,05$ ). Majski vzorci vode imajo pri gojišču R2A za 43 % ( $p = 0,003$ ) višje vrednosti CFU/ml kot februarjski, pri gojišču 1/100 NA pa za 70 % ( $p = 0,08$ ). Primerjava vrednosti vzorcev majske vode med NA in 1/100 NA ter med R2A in 1/10 R2A pokaže, da

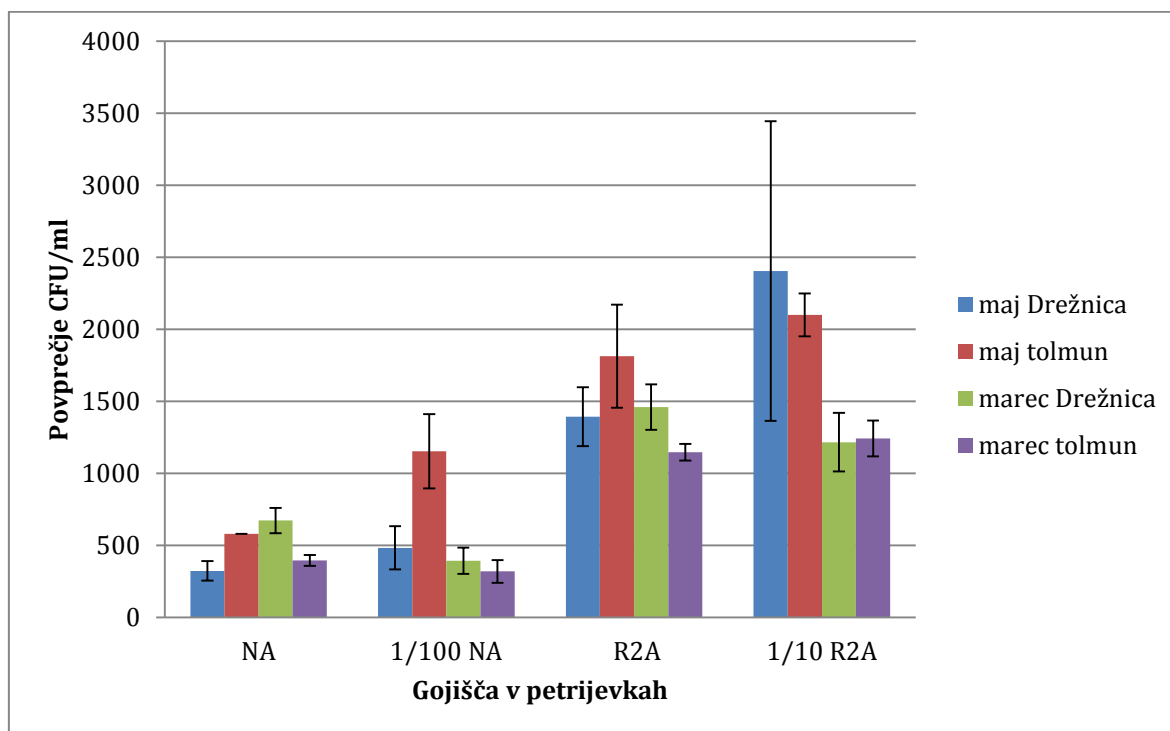


imata v obeh primerih redčeni različici za 73 % ( $p = 0,04$ ) oziroma 26,5 % ( $p = 0,45$ ) višje povprečje CFU/ml. Če za vzorce majske vode primerjamo še gojišči R2A z NA, diagram pokaže, da je bilo pri R2A za 80 % ( $p = 0,001$ ) več CFU/ml kot pri NA.



**Slika 9:** Stolpni diagram povprečnih vrednosti CFU/m<sup>3</sup> za vzorce zraka pri Paraboli, pridobljene maja 2009 in februarja 2010.

Razlik v vrednostih CFU/m<sup>3</sup> med mestoma »Zrak 1« in »Zrak 2« statistično nismo mogli dokazati. Gojišče R2A ima pri vzorcih »maj zrak1« 82 % ( $p = 0,005$ ) in pri vzorcih »maj zrak2« 74 % ( $p = 0,01$ ) višje vrednosti CFU/m<sup>3</sup> od istih vzorcev gojišča NA. Podobno stanje je pri 1/10 R2A, od katerega ima gojišče 1/100 NA pri vzorcu »maj zrak1« 68 % ( $p = 0,001$ ) nižje vrednosti CFU/m<sup>3</sup>. Podobno kot pri vzorcih vode in predvsem snega, so tudi pri vzorcih zraka februarški rezultati precej nižji kot majske. Gojišče R2A ima pri mestu »maj zrak1« za 72 % ( $p = 0,01$ ), pri mestu »maj zrak2« pa za 77 % ( $p = 0,002$ ) višje vrednosti CFU/m<sup>3</sup> od mesta »februar zrak1«. Pri gojišču 1/10 R2A ima mesto »maj zrak1« za 91 % ( $p = 9 \times 10^{-4}$ ) višjo vrednost CFU/m<sup>3</sup> od mesta »februar zrak1«, »maj zrak2« pa za 82 % ( $p = 0,05$ ) višjo vrednost od »februar zrak2«. Pri gojišču NA nismo mogli ugotoviti razlik med vzorčnimi mesti, pri 1/100 NA pa je »maj zrak2« od mesta »februar zrak1« imel za 76 % ( $p = 0,02$ ) od »februar zrak2« pa za 79 % višji CFU/m<sup>3</sup>.

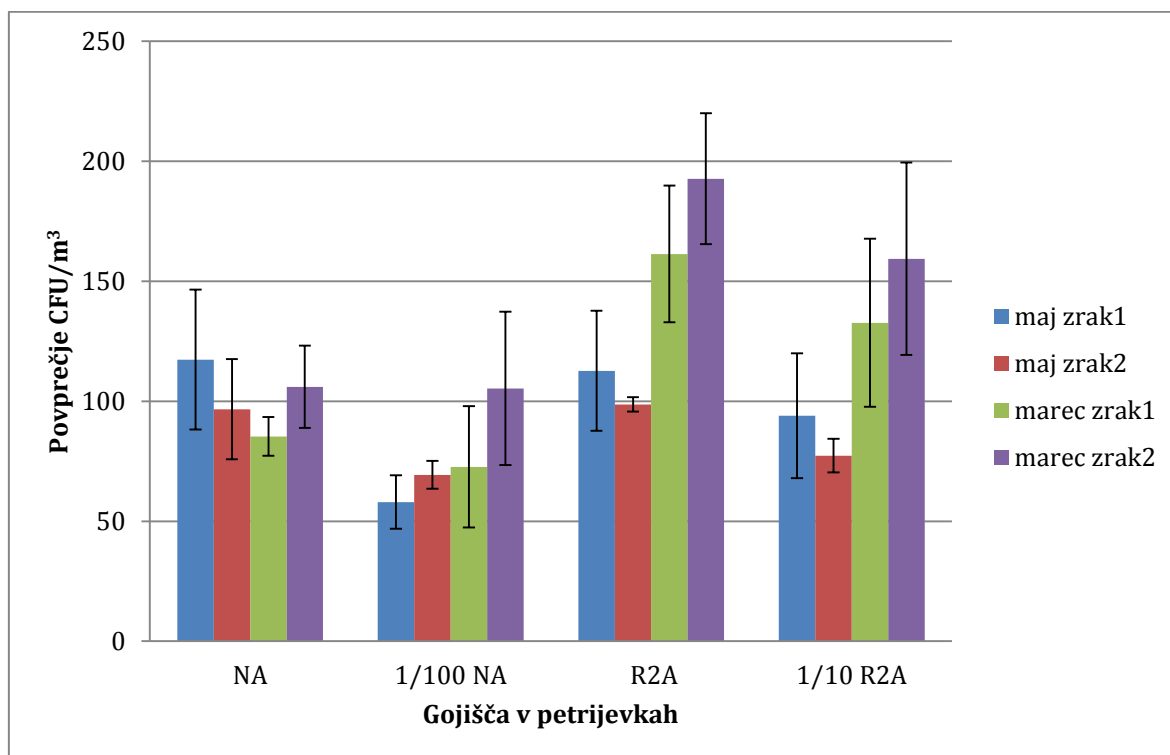


**Slika 10:** Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/ml za vzorce vode pri Kozjaku, pridobljene maja 2009 in marca 2010.

Majsko vzorčenje vode iz tolmana Kozjaka je v primerjavi z marčevskim prineslo mnogo višje vrednosti CFU/ml pri gojiščih NA ( $p = 0,014$ ), 1/100 NA ( $p = 0,023$ ) in 1/10 R2A ( $p = 0,002$ ). Pri vodnih vzorcih iz Drežnice tega nismo mogli dokazati, pri gojišču NA je marčevsko štetje pokazalo celo nasprotno sliko, in sicer za 48 % višji rezultat CFU/ml ( $p = 0,006$ ) od majskega. R2A gojišče kaže preko 3 krat višje vrednosti CFU/ml kot NA, ter 1/10 R2A 4 krat višje vrednosti kot 1/100 NA (z izjemo vzorčnega mesta maj tolmun, kjer je bila razlika 45 %). Preglednica 3 prikazuje izračunane p vrednosti za slednji dve primerjavi.

**Preglednica 3:** Prikazane so izračunane p vrednosti primerjave med različnimi gojišči za vzorce iz vode pri slapu Kozjak.

	Primerjava R2A z NA:	Primerjava 1/10 R2A z 1/100 NA:
maj Drežnica	$p = 0,007$	$p = 0,34$
maj tolmun	$p = 0,03$	$p = 0,01$
marec Drežnica	$p = 0,004$	$p = 0,01$
marec tolmun	$p = 0$	$p = 0,001$



**Slika 11:** Stolpični diagram povprečnih vrednosti CFU/m<sup>3</sup> za vzorce zraka pri Kozjaku, pridobljene maja 2009 in marca 2010.

Zaradi neugodnih rezultatov Studentovega t-testa nismo mogli opraviti statistično zanesljivih primerjav med različnimi vzorci zraka, razen pri gojišču R2A za vzorca »marec zrak2« in »maj zrak2«. Slednji ima za 49 % ( $p = 0,026$ ) nižje povprečje CFU/m<sup>3</sup> od vzorca »marec zrak2«.

#### 4.1.2 Rezultati sekvenciranja

##### 4.1.2.1 Kvantitativni rezultati

Glavni namen obdelave rezultatov na kvantitativni način je bil ugotoviti ekološko tendenco pojavljanja bakterij v odvisnosti od letnega časa. Za boljšo predstavbo smo združili vse seve, ki so spadali pod širšo sistematsko skupino bakterij in jih predstavili v deležih (slika 12). Uspelo nam je izolirati skupno 651 sevov iz 51 različnih rodov (preglednica 4). 22 izoliranih sevov ni bilo mogoče določiti do nivoja rodu. V prilogi A smo primerjali rodov iz naše raziskave s pojavljanjem v strokovni literaturi.

**Preglednica 4:** Seznam rodov vseh izoliranih bakterij s številčnim prikazom količine izolatov, pridobljenih pri vseh štirih vzorčenjih. Številke predstavljajo število izoliranih sevov. Za boljši pregled tabele, smo skrajšali imena vzorčnih mest. Oznaka »S« je okrajšava za vzorce iz snega, »V<sub>t</sub>« pomeni Voda tolmun, »V<sub>D</sub>« pa pomeni Voda Drežnica. »Z<sub>1</sub>« in »Z<sub>2</sub>« sta okrajšavi za vzorce iz vzorčnih mest Zrak 1 in Zrak 2.

Skupina:	<i>Actinobacteria</i> (Phylum)								<i>Firmicutes</i> (Phylum)				<i>Bacteroidetes</i> (Phylum)						
Genus:	<i>Arthrobacter</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Sanguibacter</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Salinibacterium</i>	<i>Paullibacter</i>	Vseh skupaj:	<i>Bacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Sporosarcina</i>	Vseh skupaj:	<i>Flavobacterium</i>	<i>Pedobacter</i>	<i>Sphingobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Sediminibacterium</i>	Vseh skupaj:
Parabola, 11. 5. 2009	Z <sub>1</sub>	1												13					
	Z <sub>2</sub>		1											24	1				
	V <sub>t</sub>	2							1					9	2				
	S													4					
	Σ	<b>3</b>	<b>1</b>						<b>4</b>	<b>1</b>			<b>1</b>	<b>50</b>	<b>3</b>				<b>53</b>
Parabola, 21. 2. 2010	Z <sub>1</sub>							1	8		1			5	2				
	Z <sub>2</sub>	1								1				12			1		
	V <sub>t</sub>		1			1	2							3	4			1	
	S													2			1		
	Σ	<b>1</b>	<b>1</b>			<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>22</b>	<b>6</b>		<b>2</b>	<b>1</b>	<b>31</b>
Kozjak, 21. 5. 2009	Z <sub>1</sub>								2					32		1	18		
	Z <sub>2</sub>		1	1					3					36			15		
	V <sub>D</sub>		1											7			3		
	V <sub>t</sub>								2					28			1		
	Σ		<b>2</b>	<b>1</b>					<b>7</b>				<b>7</b>	<b>103</b>		<b>1</b>	<b>37</b>		<b>141</b>
Kozjak, 15. 3. 2010	Z <sub>1</sub>								3					31	1				
	Z <sub>2</sub>	1							2					18	2		1		
	V <sub>D</sub>					1								16	1				
	V <sub>t</sub>		2											25					
	Σ	<b>1</b>	<b>2</b>			<b>1</b>			<b>4</b>	<b>5</b>			<b>5</b>	<b>90</b>	<b>4</b>		<b>1</b>		<b>95</b>
Skupno število izoliranih sevov:	4	1	6	1	1	1	2	1	17	21	1	1	23	265	13	1	40	1	320

se nadaljuje

nadaljevanje **Preglednica 4**: Seznam rodov vseh izoliranih bakterij s številčnim prikazom količine izolatov, pridobljenih pri vseh štirih vzorčenjih. Številke predstavljajo število izoliranih sevov. Za boljši pregled tabele, smo skrajšali imena vzorčnih mest. Oznaka »S« je okrajšava za vzorce iz snega, »V<sub>t</sub>« pomeni Voda tolmun, »V<sub>D</sub>« pa pomeni Voda Drežnica. »Z<sub>1</sub>« in »Z<sub>2</sub>« sta okrajšavi za vzorce iz vzorčnih mest Zrak 1 in Zrak 2.

Skupina:	α - proteobacteria (Class)																					
Genus:																Vseh skupaj:						
	<i>Sphingomonas</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Pseudochrobactrum</i>	<i>Methylbacterium</i>	<i>Devosia</i>	<i>Balneimonas</i>	<i>Novosphingobium</i>	<i>Aurantimonas</i>	<i>Carlobacter</i>	<i>Bosea</i>	<i>Sphingobium</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Sphingopyxis</i>	<i>Amaricoccus</i>	<i>Phenylbacterium</i>	<i>Novosphingobium</i>			
Parabola, 11. 5. 2009	Z <sub>1</sub>																					
	Z <sub>2</sub>																					
	V <sub>t</sub>		1	1																		
	S																					
	Σ		<b>1</b>	<b>1</b>																		<b>2</b>
Parabola, 21. 2. 2010	Z <sub>1</sub>	1	1			1																
	Z <sub>2</sub>										1	1			1	1		1				
	V <sub>t</sub>	9	2					1	1	1		1	1				1					
	S	1					1					1	1							1		
	Σ	<b>11</b>	<b>3</b>				<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>30</b>
Kozjak, 21. 5. 2009	Z <sub>1</sub>																					
	Z <sub>2</sub>																					
	V <sub>D</sub>																					
	V <sub>t</sub>		1																			
	Σ		<b>1</b>																			<b>1</b>
Kozjak, 15. 3. 2010	Z <sub>1</sub>				1	1				1	1		1									
	Z <sub>2</sub>	2									1		2									
	V <sub>D</sub>	3						2	1			1	1									
	V <sub>t</sub>	1							2	2			1	1								
	Σ	<b>6</b>			<b>1</b>	<b>1</b>				<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>4</b>								<b>19</b>
Skupno število izoliranih sevov:	17	5	1	1	1	1	1	1	3	3	3	4	5	1	1	1	1	1	1	1	1	<b>52</b>

se nadaljuje

nadaljevanje **Preglednica 4:** Seznam rodov vseh izoliranih bakterij s številčnim prikazom količine izolatov, pridobljenih pri vseh štirih vzorčenjih. Številke predstavljajo število izoliranih sevov. Za boljši pregled tabele, smo skrajšali imena vzorčnih mest. Oznaka »S« je okrajšava za vzorce iz snega, »V<sub>t</sub>« pomeni Voda tolmun, »V<sub>D</sub>« pa pomeni Voda Drežnica. »Z<sub>1</sub>« in »Z<sub>2</sub>« sta okrajšavi za vzorce iz vzorčnih mest Zrak 1 in Zrak 2.

Skupina:	<i>β - proteobacteria (Class)</i>							<i>γ - proteobacteria (Class)</i>												
Genus:	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Variovorax</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Hydrogenophaga</i>	<i>Polaromonas</i>	Vseh skupaj:	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	Vseh skupaj:	Nedeoloženi sevi:	Sešt. vseh določenih izolatov:
Parabola, 11. 5. 2009	Z <sub>1</sub>	6	1						10		1								1	
	Z <sub>2</sub>	2							13										2	
	V <sub>t</sub>	4			2				14											
	S	11							48											
	Σ	<b>23</b>	<b>1</b>		<b>2</b>			<b>26</b>	<b>85</b>		<b>1</b>						<b>86</b>		<b>4</b>	<b>171</b>
Parabola, 21. 2. 2010	Z <sub>1</sub>	1					3									1			1	
	Z <sub>2</sub>	4																	6	
	V <sub>t</sub>						2		7		1								1	
	S	2			1				3											
	Σ	<b>7</b>			<b>1</b>		<b>5</b>	<b>13</b>	<b>10</b>		<b>1</b>					<b>1</b>	<b>12</b>		<b>8</b>	<b>102</b>
Kozjak, 21. 5. 2009	Z <sub>1</sub>		1			1			18	4	2		1						2	
	Z <sub>2</sub>								21	3	2	1	1	1					1	
	V <sub>D</sub>								6				6			2			1	
	V <sub>t</sub>								1	3					2	2			1	
	Σ		<b>1</b>			<b>1</b>		<b>2</b>	<b>46</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>76</b>		<b>5</b>	<b>230</b>
Kozjak, 15. 3. 2010	Z <sub>1</sub>	3	1						1										1	
	Z <sub>2</sub>	4							1		1								2	
	V <sub>D</sub>	3			1				6	1						1			1	
	V <sub>t</sub>	1																	1	
	Σ	<b>11</b>	<b>1</b>		<b>1</b>			<b>13</b>	<b>8</b>	<b>1</b>		<b>1</b>				<b>1</b>	<b>11</b>		<b>5</b>	<b>147</b>
Skupno število izoliranih sevov:	41	1	2	1	3	1	5	<b>54</b>	149	11	2	6	7	2	2	4	2	<b>185</b>	22	<b>650</b>

Izmed vseh izoliranih sevov je bilo najštevilčneje zastopano deblo *Bacteroidetes* s 320 izolati (49,2 %). Znotraj te skupine je največ predstavnikov imel rod *Flavobacterium* (265), kar 82,8 % znotraj debela, oziroma kar 40,7 % v primerjavi z vsemi rodovi iz ostalih debel. Pri obeh vzorčenjih na Kozjaku smo v primerjavi s Parabolom (50 in 22 sevov) pridobili precej več sevov tega rodu (103 in 90). Skupaj z rodom *Pseudomonas* iz razreda *Gammaproteobacteria* sta bila v primerjavi z vsemi ostalimi rodovi najštevilčnejša. Pri obeh slapovih in vseh vzorčenjih na vseh vzorčnih mestih sta bila sorazmerno enakomerno porazdeljena. Izjema je v treh primerih, ko ni bil prisoten *Pseudomonas*.

Iz razreda *Alphaproteobacteria* smo izolirali 52 sevov iz 19 rodov z najštevilčnejšim predstavnikom *Sphingomonas* (11 izolatov). Pojavil se je pri obeh slapovih, a le pri zimskem vzorčenju, kot tudi velika večina ostalih rodov. Pri februarjem vzorčenju Parabole je kar 16 od skupno 34 izoliranih rodov pripadalo alfa proteobakterijam (47 %). Pri marčevskem vzorčenju Kozjaka pa 8 od skupno 22 (36 %).

Malenkost več izolatov (54) kot pri alfa proteobakterijah smo uspeli zbrati za beta proteobakterije, in sicer iz sedmih rodov. Najbolj številčen je bil rod *Janthinobacterium* z 41 sevi, ki se je skupaj z rodom *Pedobacter* pojavil v vseh vzorčenjih, razen pri majskem na Kozjaku.

Gamaproteobakterije so s 185 izoliranimi sevi iz 9 rodov predstavljale 28 % vseh sevov, od katerih je 8 rodov bilo prisotnih v vzorcih majskega vzorčenja Kozjaka. To predstavlja polovico od vseh rodov, ki so bili izolirani pri majskem vzorčenju. Najštevilčnejši predstavnik tega razreda je bil *Pseudomonas* (149 sevov), ki je bil mnogo bolj zastopan pri obeh majskih vzorčenjih kot pa pozimi. Gledano le vzorčenje pri Paraboli maja 2009, smo iz snega pridobili 56,5 % sevov tega rodu, poleg katerega smo izolirali le še *Janthinobacterium* in *Flavobacterium*, od katerih pa je bil *Pseudomonas* prevladujoč rod s 76 % deležem od skupno 63 izoliranih sevov. Zimski vzorci snega so iz skupno le trinajstih sevov prinesli 9 različnih rodov.

Deblu *Actinobacteria* je pripadalo 8 rodov, ki pa so imeli vsak le po nekaj izoliranih sevov, vseh skupaj 18. Po vzorčnih mestih so bili precej enakomerno razporejeni.

Vredno je izpostaviti tudi tri potencialno patogene rodove, ki spadajo v družino enterobakterij (*Enterobacteriaceae*). Bakterije iz rodu *Serratia* so bile izolirane pri obeh

slapovih, v treh primerih iz zraka in enem primeru iz vode. Bakterije iz rodu *Erwinia* so bile izolirane samo pri Kozjaku in sicer pri majskem vzorčenju, po en sev na obeh vzorčnih mestih »Zrak 1« in »Zrak 2«, dva seva bakterije iz rodu *Shigella* pa v vodi tolmana pri Kozjaku.

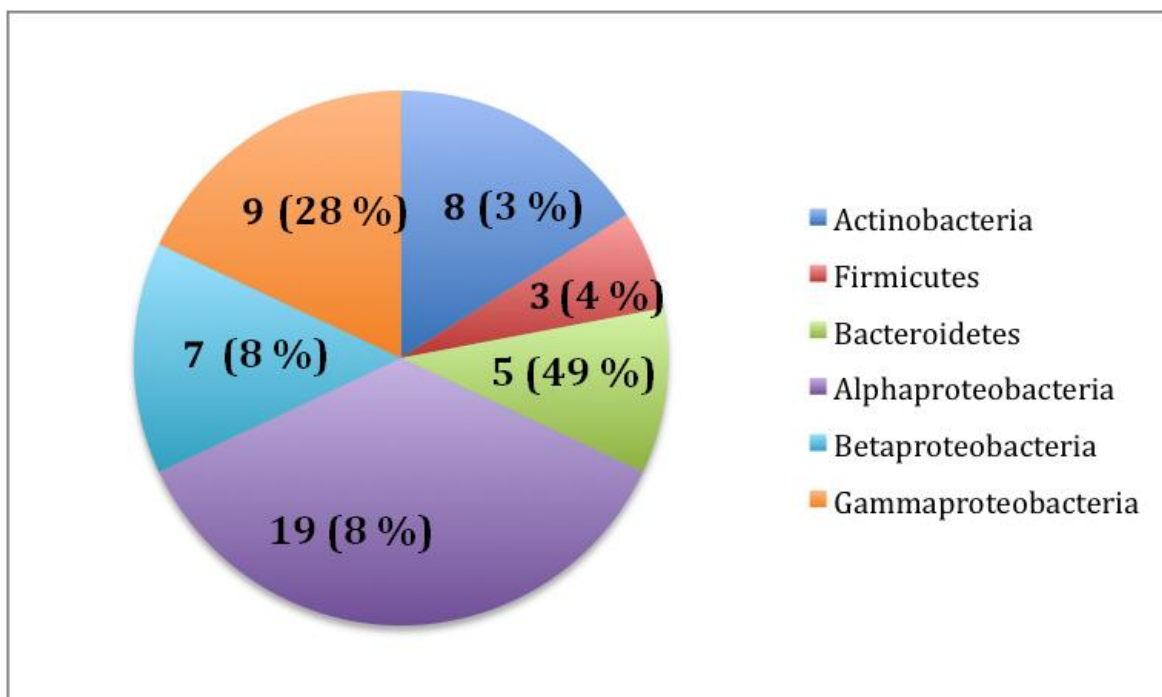
Za vsako vzorčenje posebej smo izračunali diverzitetni indeks z estimatorjem bogatosti vrst Chao1 (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Primerjava bogatosti bakterijskih rodov med vzorci z uporabo diverzitetnega indeksa Chao1.

Vzorčno mesto:	Chao1			
	Kozjak, 21. 5. 2009	Kozjak, 15. 3. 2010	Parabola, 11. 5. 2009	Parabola, 21. 2. 2010
Zrak 1	12	39	5	17,5
Zrak 2	13,5	11,2	7,5	38
Voda tolmun	8,5	4,5	9,8	28,3
Voda Drežnica/Sneg Parabola	6	23,5	3	14

Z dvema izjemama pri slapu Kozjak, se je pri obeh slapovih pokazala precej večja raznolikost v marčevskem/februarskem vzorčenju v primerjavi z majskim. Če primerjamo oba slapa, se pokaže, da ima Parabola pri majskem vzorčenju višji indeks od Kozjaka le pri »Voda tolmun«. Pri zimskem vzorčenju pa ima višji indeks pri »Zrak 2« ter »Voda tolmun«.





**Slika 12:** Tortni diagram prikazuje število izoliranih rodov, ki pripadajo določeni višji sistematski skupini, ter kvantitativni delež te skupine glede na celokupno število vseh izolatov.

#### 4.1.2.2 Kvalitativni rezultati

Glavni namen naše raziskave je bil potrditi hipotezo o nahajanju enakih bakterijskih vrst v snegu, vodi in zraku. To smo ugotavljali s programom Mega 4, ki sorodnost organizmov ugotavlja preko izračunavanja evulucijske razdalje po Kimurini dvoparametrični metodi. Izolirani bakterijski sevi si morajo biti med seboj čimbolj sorodni, oziroma pripadati enaki vrsti, saj to pomeni, da imajo enake fiziološke odzive na okolje. Na podlagi rezultatov izračuna sorodnosti na nivoju 16 S rRNA gena, je za predstavnike znotraj istega rodu, ki smo jih dobili tako v zraku kakor v vodi (pri Paraboli tudi v snegu), program izrisal sorodstveno drevo. To nam je služilo kot zadnja faza v iskanju evulucijsko najsorodnejših predstavnikov znotraj rodu neke bakterije.

##### 4.1.2.2.1 Kozjak

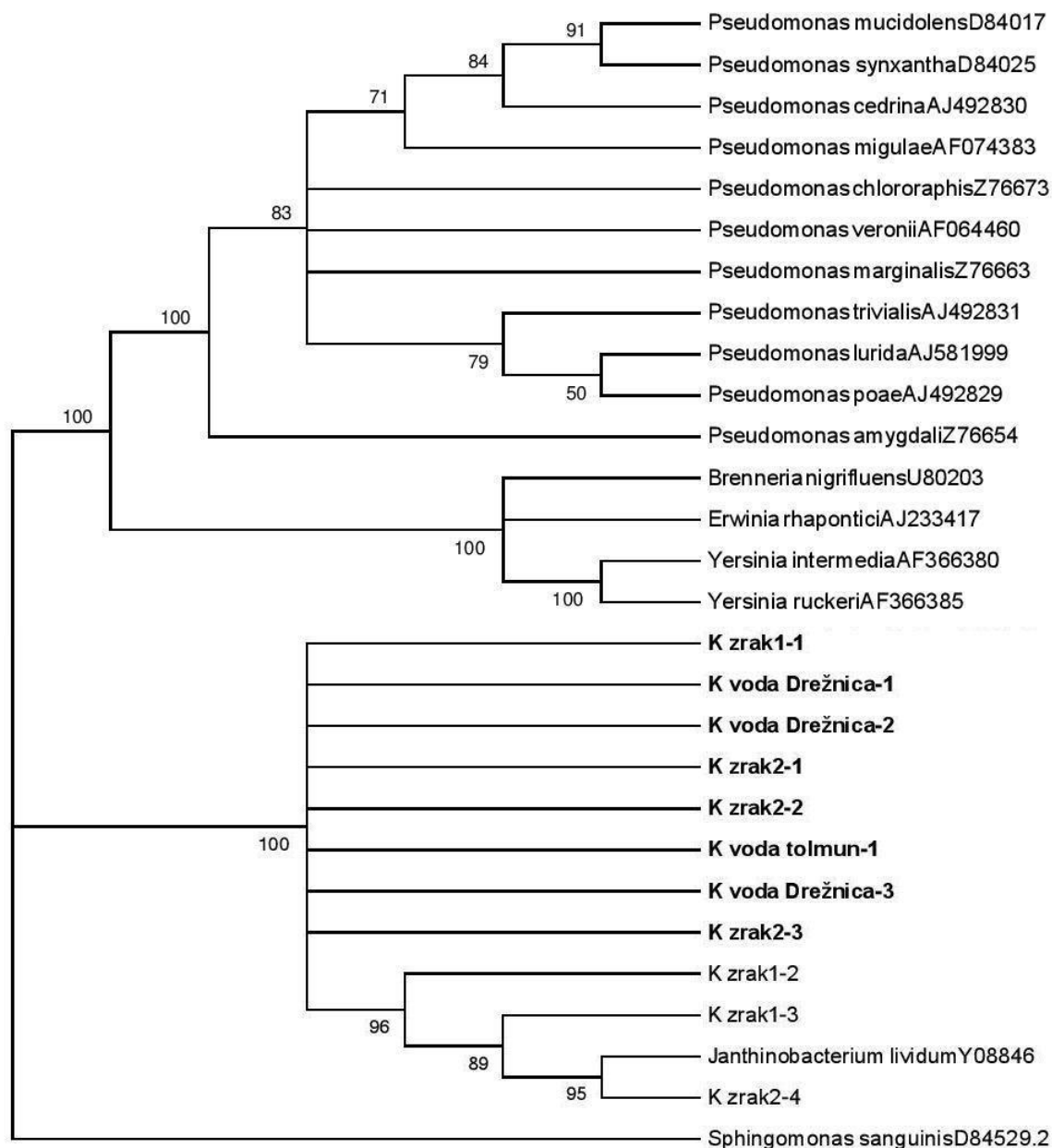
Znotraj kriterija, da se bakterije pojavijo v obeh vzorcih vode in zraka, smo v spomladanskem vzorčenju Kozjaka izolirali *Pseudomonas*, *Flavobacterium* in

*Chryseobacterium*, pri zimskem vzorčenju pa le *Flavobacterium* in *Janthinobacterium* (preglednica 6).

**Preglednica 6:** Kvalitativni prikaz rodov bakterij iz Kozjaka, ki so bile izolirane v vseh štirih vzorčnih mestih. Izjemi sta *Flavobacterium* in *Chryseobacterium* iz leta 2009. Številke predstavljajo število posameznih sevov.

Datum vzorčenja:	21. 5. 2009			15. 3. 2010	
Izolati:	<i>Pseudomonas</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Janthinobacterium</i>
Voda Drežnica	3	0	0	7	3
Voda tolmun	1	8	1	10	1
Zrak 1	5	7	16	9	1
Zrak 2	12	17	13	5	3
Skupaj:	21	32	30	31	8

Kladogram rodu *Janthinobacterium*, katerega seve smo vzorčili marca 2010 (slika 13), prikaže vse najsorodnejše seve, ki smo jih tudi uporabili pri dokazovanju hipoteze. Krajše kot so evolucijske razdalje med sekvencami, bolj imajo podobne fiziološke zahteve (Mount D.W., 2004).



**Slika 13:** Kladogram prikazuje med seboj sorodne seve roda *Janthinobacterium*, pridobljene marca 2010, iz slapa Kozjak. Črka "K" je okrajšava za Kozjak. K voda Drežnica-1 do K voda Drežnica-3 predstavljajo tri vzorce, izolirane v vodi potoka Kozjak pri vasi Drežnica. K voda tolmun-1 predstavlja vzorec, izoliran iz vzorca vode pri tolmunu pod slapom Kozjak. K zrak1-1 do K zrak1-3 predstavljajo tri vzorce, izolirane na prvem vzorčnem mestu za zrak, K zrak2-1 do K zrak2-4 pa štiri vzorce izolirane na drugem vzorčnem mestu za zrak. Imena vseh izolatov, ki jih je kladogram uvrstil med najbližje sorodnike, imajo odebeljen tisk. Ob vejah so prikazane bootstrap vrednosti.

#### 4.1.2.2.2 Parabola

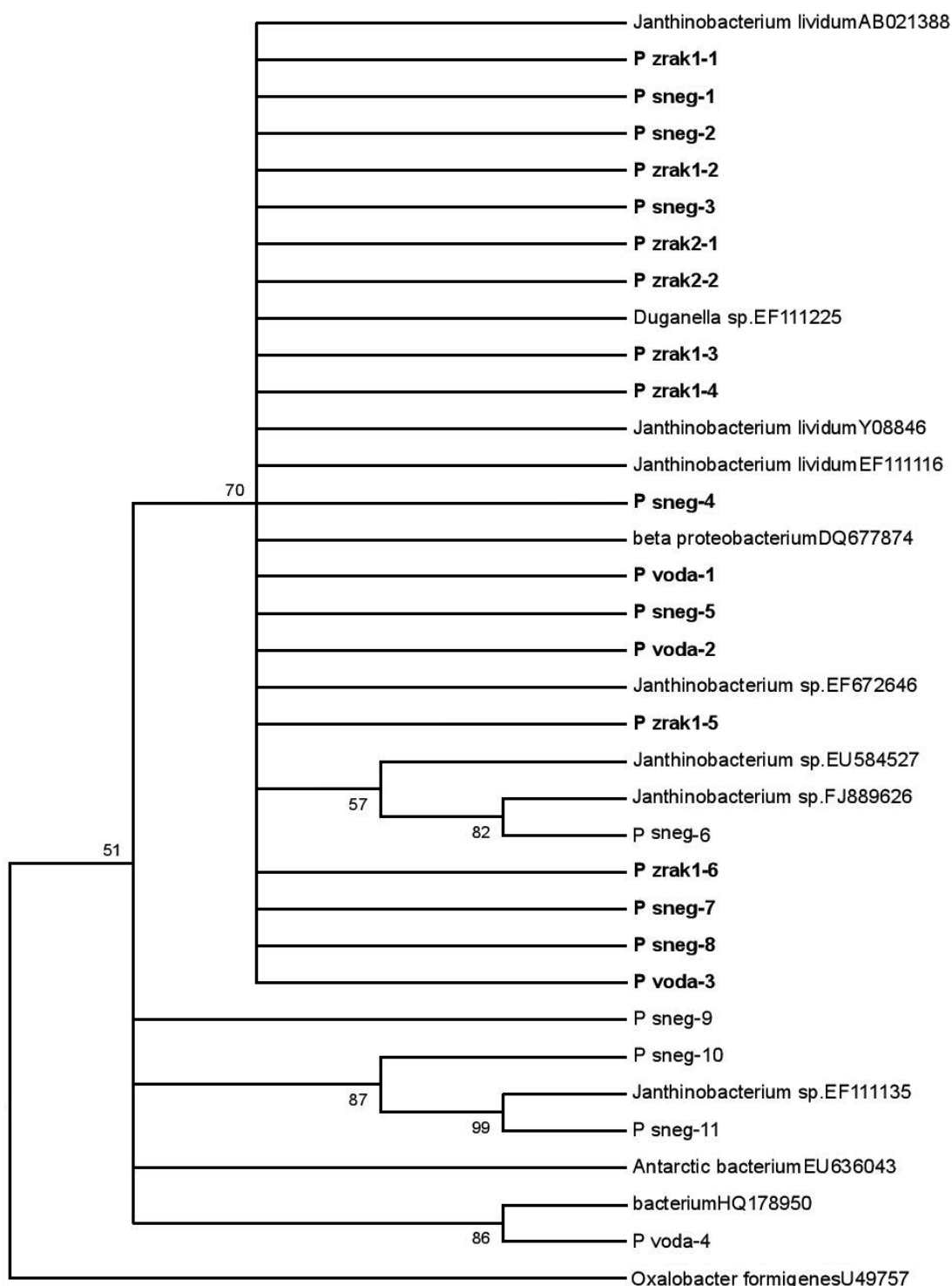
Vzorčenje slapa Parabole je samo maja 2009 prineslo rezultate, kjer so bili evolucijsko sorodni sevi prisotni na vseh štirih vzorčnih mestih (preglednica 7).

**Preglednica 7:** Prikaz rodov bakterij iz Parabole, ki so bile izolirane v vseh štirih vzorčnih mestih. Številke predstavljajo število posameznih sevov.

Datum vzorčenja: 11. 5. 2009		
	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
Sneg	7	29
Voda tolmun	4	5
Zrak 1	5	6
Zrak 2	2	8
Skupaj:	18	48

---

Sorodstveno drevo rodu *Janthinobacterium*, katerega seve smo vzorčili maja 2009 (slika 14), prikaže vse najsorodnejše seve, ki smo jih uporabili tudi pri dokazovanju hipoteze. Sevov, katerih Kimurina dvoparametrična metoda ni uvrstila med najbližje evolucijske razdalje, nismo upoštevali (P voda-4 ter P sneg-6, 9–11).



**Slika 14:** Kladogram prikazuje med seboj sorodne seve roda *Janthinobacterium*, pridobljene maja 2009, iz slapa Parabola. Črka "P" je okrajšava za Parabolo, P sneg-1 do P sneg-11 predstavljajo enajst vzorcev, pridobljenih iz snega, deponiranega nad slapom. P voda-1 do P voda-4 predstavljajo štiri vzorce, izolirane iz vzorca vode pri tolmu pod slapom Parabola. P zrak1-1 do P zrak1-6 predstavljajo šest vzorcev, izoliranih na prvem vzorčnem mestu za zrak, P zrak2-1 do P zrak2-2 pa dva vzorca, izolirana na drugem vzorčnem mestu za zrak. Imena vseh izolatov, ki jih je kladogram uvrstil med najbližje sorodnike, imajo odebeljen tisk. Ob vejah so prikazane bootstrap vrednosti.

#### 4.1.2.2.3 Primerjava med letnima časoma

Za primerjavo rezultatov med obema letnima časoma smo izbrali *Flavobacterium*, saj je bil to edini rod, ki je bil pri obeh slapovih prisoten v vodi in zraku. Pri Paraboli smo naredili izjemo, saj februarja 2010 za vzorčni mesti »Voda tolmun« ter »Zrak 1« nismo uspeli izolirati nobenega seva. Navkljub okrnjenim rezultatom, je v tem primeru vseeno pomemben dokaz najden en sev v snegu ter 7 sevov v zraku (»Zrak 2«).

#### Parabola:

**Preglednica 8:** Primerjava med izolati rodu *Flavobacterium* iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri Paraboli. Številke predstavljajo število sevov.

Datum vzorčenja:	11. 5. 2009	21. 2. 2010
Sneg	1	1
Voda tolmun	2	0
Zrak 1	4	0
Zrak 2	6	7
Skupaj:	13	8

Nižje številke izolatov iz februarskega vzorčenja korelirajo tudi z nizkim številom CFU/ml iz kvantitativnih rezultatov.

#### Kozjak:

**Preglednica 9:** Primerjava med izolati rodu *Flavobacterium* iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri Kozjaku. Številke predstavljajo število sevov.

Datum vzorčenja:	21. 5. 2009	15. 3. 2010
Voda Drežnica	2	7
Voda tolmun	12	7
Zrak 1	10	5
Zrak 2	22	4
Skupaj:	46	23

Pri majskem vzorčenju smo uspešno potrdili prisotnost sevov *Flavobacterium* pri vseh vzorčnih mestih, s tem, da jih je bilo maja 50 % več (46).

#### 4.1.2.2.4 Primerjava med obema slapoma

Izkazalo se je, da je bil maja 2009, rod *Flavobacterium* prisoten na vseh štirih vzorčnih mestih pri obeh slapovih. Pri zimskem vzorčenju Parabole pa so bili pri mestu »Zrak 2« najdeni le 3 sevi (preglednica 10).

**Preglednica 10:** Primerjava med izolati rodu *Flavobacterium* iz obeh letnih časov iz vseh štirih vzorčnih mest pri obeh slapovih. Številke predstavljajo število sevov.

Vzorčno mesto:		MAJ 2009	FEBRUAR/MAREC 2010
KOZJAK	Voda Drežnica	2	5
	Voda tolmun	10	7
	Zrak 1	7	2
	Zrak 2	19	3
$\Sigma$		38	17
PARABOLA	Sneg	1	0
	Voda tolmun	4	0
	Zrak 1	5	0
	Zrak 2	5	3
$\Sigma$		15	3

Tudi tu primerjava kaže podoben trend nizkega števila izoliranih sevov pri februarški Paraboli, za ostala tri vzorčenja pa so sevi sorazmeroma enakomerno porazdeljeni po vseh vzorčnih mestih. Tudi tokrat so majske številke višje kot februarske.

## 4.2 Kemijsko-fizikalne analize

Lokacija: Kozjak

Datum vzorčenja	pH	Kisik (mg/l)	Nasičenost z O <sub>2</sub> (%)	Prevodnost (μS/cm)	T <sub>VODA</sub> (°C)	Pretok (m <sup>3</sup> /s)	T <sub>ZRAK</sub> (°C)	Zračni tlak (mbar)	Relativna vlažnost (%)
21. 5. 2009	8,3	9,2	95	259	13,8	0,061	16,5	986,7	84,0
15. 3. 2010	8,3	9,9	87	291	3,3	0,047	5,1	982,3	72,3

**Preglednica 11:** Vrednosti kemijsko-fizikalnih meritev pri Kozjaku.

Meritev koncentracije nitratov in ortofosfatov smo pri obeh slapih opravili samo enkrat, saj je bil namen le potrditi domnevo, da gre za oligotrofno vodno okolje.

Koncentracija NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/l): 2,7.

Koncentracija PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg/l): 0,036.

Lokacija: Parabola

**Preglednica 12:** Vrednosti kemijsko-fizikalnih meritev pri Paraboli.

Datum vzorčenja	pH	Kisik (mg/l)	Nasičenost z O <sub>2</sub> (%)	Prevodnost (μS/cm)	T <sub>VODA</sub> (°C)	Pretok (m <sup>3</sup> /s)	T <sub>ZRAK</sub> (°C)	Zračni tlak (mbar)	Relativna vlažnost (%)
11. 5. 2009	7,5	11,6	89	124	7,6	0,095	13,6	935,8	78,7
21. 2. 2010	8	11,1	89	187	0,7	0,075	-0,9	926,7	77,6

Koncentracija NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/l): 2,4.

Koncentracija PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (mg/l): 3,45 x 10<sup>-3</sup>.



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 Razprava

#### 5.1.1 Štetje CFU

Četudi metode gojenja kulturabilnih bakterij omogočajo karakterizacijo le 1 % vrst, nam tak način preučevanja daje pomembne informacije o distribuciji in ekologiji mikroorganizmov, saj so bakterije, zrasle na gojiščih, nedvoumno viabilne (Després et al., 2007). Med slapovoma je bilo za pričakovati večje razlike v vrednostih CFU, predvsem zaradi prispevnega območja pod Krnom, ki je pod vplivom človeka. Ker sestava gojišča delno selekcionira rast določenih bakterij, smo uporabili gojišča bogata s hranili in gojišča revnejša s hranili (oligotrofna gojišča), s čimer smo želeli zajeti bakterije, prilagojene na različno koncentracijo hranil.

##### 5.1.1.1 Parabola

###### 5.1.1.1.1 Vzorci vode in snega

Velike razlike pri vrednostih CFU/ml med vzorci majskega in februarskega snega najverjetneje izhajajo iz dejstva, da je majski sneg v bistvu plazovina, torej zelo zbit in nekaj mesecev star sneg, ki je prišel izpod Oblice (2240 m) ter Vrha Rup (2245 m). Takšen sneg, ki predstavlja seštevke vseh snežnih padavin pretekle zime, pomeni večjo gostoto in s tem tudi višjo koncentracijo zajetih bakterij. Nizek februarski rezultat CFU/ml pa prikazuje stanje bakterijske flore po enkratnem sneženju, ko je zapadlo 5 cm novega snega.

Ob taljenju plazovin ali ledenikov, bi ti lahko pomembno vplivali na bakterijsko sestavo potokov, ki izvirajo izpod njih. K mikrobnim sestavi plazovine naj bi prispevalo tudi dejstvo, da so se nekatere oligotrofne psihrofilne oziroma psihrotrofne bakterije na/v snegu/ledu sposobne tudi razmnoževati. V japonskem gorovju Tateyama so nekatere bakterijske vrste kazale precej drugačno sezonsko dinamiko od mineralnih delcev, saj je bilo v avgustu njihovo število 100 do 4000 krat večje od števila anorganskih delcev, kar bi lahko pojasnili z rastjo bakterij (Segawa et al., 2004). Segawa s sod. (2004) je dokazal, da je *Janthinobacterium lividum* v obdobju meseca marca in aprila hitro povišal število, bolj kot

npr. alge in cianobakterije, zato trdi, da se bakterije na snegu razmnožujejo vsaj v toplejšem delu leta, ko prihaja do taljenja. V splošnem pa je podatkov o tem zelo malo in ne ve se, katere skupine so sposobne rasti v takih razmerah (Segawa et al., 2004). Na bakterijsko biomaso na površju snega torej vpliva sama rast bakterij, pa tudi dovajanje iz atmosfere, koncentriranje kot posledica preobražanja snega ter odtekanje kot posledica taljenja (Segawa et al., 2004). Ti sezonski dejavniki imajo zelo podoben vpliv na bakterije kot tudi na anorganske mineralne delce, saj njihov efekt zavisi predvsem od velikostnih dimenzij delcev.

Staljen sneg torej vpliva na bakterijsko sestavo vode Parabole. Če bi na primer prišlo do zime z zelo malo snežnimi padavinami in bi bil maja ves sneg že staljen, bi bilo za pričakovati drugačne vrednosti CFU/ml v vodi.

Trend višjih vrednosti CFU/ml iz majskih izolatov je opaziti tudi pri vzorcih vode, kjer so pri gojiščih R2A in 1/100 NA vrednosti bile precej višje v primerjavi s februarskimi. K tako veliki razliki je najverjetneje prispevala nizka temperatura vode, le 0,7 °C, kar je mejni dejavnik pri metabolizmu in rasti mikroorganizmov. Prav tako se pri obeh gojiščih kaže boljše rast na njunih redčenih različicah, ki vsebujejo nižje koncentracije hranil, kar lahko pomeni boljše pogoje za oligotrofne bakterije.

Primerjava med gojišči R2A in NA kažejo precej višje vrednosti CFU/ml v korist R2A pri vzorcih snega in vode. Razlika v vrednostih se giblje med 48 % ter 80 %, kar nakazuje na to, da je sestava R2A gojišča ugodnejša za rast bakterij iz teh vzorcev kot pa pri NA.

#### **5.1.1.1.2 Vzorci zraka**

Primerjava rezultatov CFU/m<sup>3</sup> med obema vzorčenji jasno pokaže, da je število bakterij v vodi in zraku odvisno od prisotnosti oziroma odsotnosti taljenja snega. Ob visokih vrednostih CFU/ml snega iz majskega vzorčenja so bile temu primerno visoke vrednosti tudi pri vodi in zraku. Pozimi je slika ravno nasprotna. Pri nizkih količinah bakterij v snegu in vodi se jih je posledično manj pojavljalo tudi v aerosolih. Če primerjamo vzorčni mesti »Zrak 1«, torej 20 m od slapu, ter »Zrak 2«, ki je od slapu oddaljeno 50 m, bi bilo pri mestu »Zrak 2« za pričakovati nižje vrednosti CFU/m<sup>3</sup>, saj je bolj oddaljeno od točke aerosolizacije - slapu. Vzrok bi bil v tem, da se koncentracija aerosolov z oddaljevanjem

od vira vedno znižuje, saj se ti na tej medsebojni razdalji 30 m vedno bolj razpršujejo v okolico. Vendar naši rezultati CFU/m<sup>3</sup> med tema dvema mestoma niso pokazali nobene specifične tendence v razmerju koncentracij bakterij v zraku. Razlogov bi lahko bilo več: (i) vzorčni mesti sta bili izbrani preblizu druga drugi ter da bi se ta logična domneva zmanjševanja koncentracije aerosolov z oddaljevanjem od vira začela kazati šele ob večji oddaljenosti, (ii) na mestu »Zrak 2« so bile prisotne tudi bakterije iz zraka, ki so prišle iz okolice in so le-te dodatno vplivale na število CFU/m<sup>3</sup>, (iii) da so bile kapljice na mestu »Zrak 1« velike z manj bakterijami, ki pa so se na poti do mesta »Zrak 2« zaradi izhlapevanja koncentrirale.

Na porazdelitev aerosolov v bližnji okolici slapov imajo namreč lahko vpliv tudi lokalni zračni tokovi. Ti so odvisni od mikroklima ter površinskih oblik v okolici slapu, ki tem tokovom predstavljajo ovire in prepreke, ki jih preusmerjajo ali pa kanalizirajo v določeno smer. Razdaljo, ki jo bo prepotoval nek aerosol, seveda določata vodni pretok oziroma »masa« slapu ter njegova višina. Večja masa vode aerosolom predstavlja večjo potisno silo v horizontalni smeri.

### **5.1.1.2 Kozjak**

#### **5.1.1.2.1 Vzorci vode**

Glavna razloga, da so bile meseca maja vrednosti CFU/ml višje kot marca, sta najverjetneje v tem, da je bila spomladi temperatura vode kar za 10,5 °C višja kot pozimi, ter, da je spomladi večji pretok snovi v okolju. Zgodaj spomladi se namreč zamrznjena tla zmehčajo, zato se poveča predvsem izpiranje organskih snovi v vodna telesa, kjer se pospešuje rast bakterij.

#### **5.1.1.2.2 Vzorci zraka**

Zaradi neugodnih rezultatov Studentovega t-testa nismo mogli opraviti statistično zanesljivih primerjav med različnimi vzorci zraka, razen pri gojišču R2A za vzorca »marec zrak2« in »maj zrak2«. Slednji je imel za 49 % nižje povprečje CFU/m<sup>3</sup> od vzorca »marec zrak2«. Če pogledamo na preostale rezultate le skozi opisno statistiko, ti kažejo podobnost z zgornjo primerjavo. Višji zimski rezultat CFU/m<sup>3</sup> bi lahko pojasnili s tem, da je bilo

takrat prisotnih več bakterij s hidrofobnim značajem. Da bi jih lahko izolirali še več, pa bi bilo potrebno uporabiti drugačna gojišča. Podobno kot pri Paraboli, obratno sliko v povprečnih vrednostih CFU/m<sup>3</sup> kaže primerjava med vzorčnima mestoma »Zrak 1« in »Zrak 2«, torej bi lahko vzroki za takšno stanje bili kot pri Paraboli. Tudi zimski vodni pretok je bil manjši, kar naj bi vplivalo na manj intenzivno aerosolizacijo in posledično nižje povprečne vrednosti CFU/m<sup>3</sup>.

Domneve o višjih povprečnih vrednosti CFU/ml pri Kozjaku v primerjavi s Parabolo nismo mogli dokazati. Ko smo primerjali vzorčni mesti »marec zrak1« in »marec zrak2« pri Kozjaku z mestoma »februar zrak1« in »februar zrak2« pri Paraboli, so bile potrjene višje vrednosti CFU/m<sup>3</sup> pri večini gojišč v prid vzorčnima mestoma iz Kozjaka. Oligotrofno okolje potoka Fratarica lahko prispeva k manjšemu številu kulturabilnih bakterij, nasprotno pa višja temperatura vode pri Kozjaku in predvsem človeški vpliv na višje koncentracije hranil, nudi boljše pogoje za rast bakterij.

## 5.1.2 Rezultati sekvenciranja

### 5.1.2.1 Kvantitativni rezultati

Najštevilčneje zastopano deblo je bilo *Bacteroidetes*, a predvsem po zaslugi rodu *Flavobacterium*, ki je z 265 sevi predstavljal 40,7 % vseh izolatov oziroma 83 % znotraj debela. Predstavniki tega rodu so Gram negativne bakterije, ki zasedajo najrazličnejša okolja (niše), od prsti, sedimentov pa do prebavil živali. Glede na naše rezultate, smo pričakovali, da bo v znanstveni literaturi ta rod bakterij večkrat omenjen, a o njegovi prisotnosti v vodi oblakov na gori Puy de Dôme v Franciji, kjer pa je bil najden le 1 sev, piše le Amato s sod. (2005, 2006). Možna razlaga za boljšo rast v vodi Kozjaka bi lahko bila višja temperatura ter rahlo višja koncentracija nitratov in ortofosfatov. Vrednosti izolatov iz vseh štirih vzorčenj zraka kažejo, da se ta rod »dobro« aerosolizira, saj je bilo tu najdenih kar 64,5 % vseh sevov. Nekatere vrste tega rodu lahko povzročajo obolenja pri sladkovodnih ribah (Starliper, 2011).

Za iz razreda *Alphaproteobacteria* izolirane skupine *Sphingomonas*, *Aurantimonas* in *Methylobacterium* velja, da živijo v mrzlih okoljih in se posledično na takih območjih pojavljajo med izoliranimi vzorci (Christner et al., 2001; Zhang et al., 2002; Foght et al.,

2004). Njihove fiziološke lastnosti jim omogočajo življenje v okolju, primerljivim z vodo v oblakih, saj nizke količine nutrientov in nizke temperature izboljšajo njihovo možnost za preživetje (Amato et al., 2006).

Visok odstotek sevov rodu *Pseudomonas* v majskem snegu nakazuje, da spada med bakterije, prilagojene na ekstremne razmere, ki so sposobne preživetja in mogoče celo razmnoževanja v snegu/ledu. Uspeli so ga namreč uspeli izolirati celo iz 750.000 let starega ledu (Christner et al., 2003). Iz svežega februarkega snega pa so bili izolirani samo trije sevi. Vzrokov za manjšo pestrost izoliranih rodov v majskem snegu v primerjavi s svežim februarkega bi bilo lahko več. Pri višanju temperatur zraka in spremembah zračne vlage in pritiska, se začnejo pravilne kristalne strukture snežink rušiti, kar lahko negativno vpliva na preživetje nekaterih bakterijskih vrst. S kopičenjem snežnih padavin tekom zime se nalagajo tudi v snežinkah ujete bakterije, med katerimi bi nekatere imele selekcijsko prednost pri preživetju v takšnih razmerah.

O tem, da ima *Pseudomonas* dobre sposobnosti aerosolizacije, govori v prid podatek, da je bilo skupno iz zraka izoliranih kar 64 sevov (43 %).

Enterobakterije *Serratia*, *Erwinia* in *Shigella* so potencialno patogene Gram negativne bakterije, ki so bile izolirane pri obeh slapovih. Kljub skromnemu številu vseh sevov, pri Kozjaku prevladuje pojavnost enterobakterij, katerih izvor bi najverjetneje bil izliv kanalizacije v potok ter izpiranje s pašnikov. Organsko onesnaževanje vode na območjih, iz katerih se ta steka v slapove, bi torej lahko pospeševalo širjenje patogenov po zraku. *Serratia* se je pojavila tudi pri obeh vzorčenjih Parabole, in sicer maja v »Zrak 2« (1 sev, 1/100 NA) ter februarja v vodi (1 sev, R2A). Ima zelo širok spekter pojavljanja v okolju, kot na primer v celinskih vodah in morju, na rastlinah (sadeži, cvetovi), žuželkah, povzročajo okužbe pri vretenčarjih. Pri ljudeh se pojavljajo v bolnišnicah, povzročajo predvsem okužbe sečil, prebavil in dihal (Grimont in Grimont, 2006). Zelo dobro je prilagojena na razširjanje po zraku, zaradi sinteze rdečega pigmenta, prodigiosina, so jo v preteklosti uporabljali za proučevanje širjenja bakterij s pomočjo zračnih tokov. V petdesetih letih prejšnjega stoletja jo je ameriška mornarica uporabljala pri tajnem eksperimentu »Operation Sea-Spray«<sup>2</sup>, kjer so želeli ugotoviti, na kakšen način bi vetrovi

---

<sup>2</sup> Operacija razpršenje nad morjem

lahko prenašali biološko orožje. Nad zalivom pri San Franciscu v ZDA so iz balonov izpustili seve *Serratia marcescens* in v zelo kratkem času so se v mestu pojavila številna obolenja pljučnice in okužbe urinalnega trakta (Richards, 1979). Nekateri človeški in rastlinski patogeni naj bi imeli visoke sposobnosti aerosolizacije, saj na tak način uspešno kolonizirajo nove gostitelje (Morris et al., 2007). Torej bi *Serratia* do Parabole lahko prišla tako kot številne ostale vrste preko padavin, zračnih tokov ali pa iz odmrlih živali oziroma njihovih iztrebkov iz višje ležečih predelov.

Indeks Chao1 je predvsem pri Paraboli pokazal večjo raznolikost v marčevskem/februarskem vzorčenju v primerjavi z majskim. To je lahko tudi posledica omejitve gojitvenih metod, saj smo pri majskem vzorčenju zaradi večje številčnosti predstavnikov znotraj posameznih rodov zgrešili manj številčne. Pri marčevskem/februarskem vzorčenju pa so bili posamezni rodovi manj številčni. Načeloma pa je spomladi več hranil, kar povzroči prevlado bakterij le nekaterih vrst nad drugimi, pozimi pa se zaradi nižje koncentracije hranil to ne zgodi. Primerjava med slapoma ni pokazala izrazitejših razlik pestrosti v korist enega ali drugega.

### 5.1.2.2 Kvalitativni rezultati

Za dokazovanje hipoteze, da bakterije ob precipitaciji na goro preko pršenja slapov zopet vstopijo v atmosfero, smo se poslužili Kimurine dvoparametrične metode iskanja evolucijskih razlik med predstavniki, sposobnimi aerosolizacije, in predstavniki v viru - vodi. Predvsem smo želeli ugotoviti, katere bakterije bi bile sposobne opraviti tako pot. To smo potrdili pri skupno petih primerih pri obeh slapovih. Majsko vzorčenje je pokazalo, da je bil na vseh štirih vzorčnih mestih pri slapu Kozjak prisoten *Pseudomonas*, skupno 21 sevov. Prisotnost le-tega smo dokazali tudi pri Paraboli (majsko vzorčenje) z izstopajočim višjim številom iz vzorca v snegu, kar korelira z vrednostmi CFU istega vzorca in deluje v prid domnevam o vzrokih za ta pojav. Na vseh štirih vzorčnih mestih Parabole je bila maja, s skupno 18 sevi, prisotna tudi bakterija *Janthinobacterium*. Pri majskem vzorčenju Kozjaka *Janthinobacterium*-a in *Chryseobacterium*-a nismo uspeli potrditi le v vodi pri Drežnici. To hipoteze sicer neposredno ne potrjuje, a vseeno je za ti dve vrsti najbolj logično predvidevati, da sta v oba vzorca v zraku prišla z aerosolizacijo iz slapu. Glede na

to, da sta bili obe vrsti prisotni v vodi v tolmunu, je fizikalno gledano bolj logično to, da sta tja prišli iz potoka nad slapom kot pa, da je njun izvor atmosferski in sta se proti smeri vetra, ki piha po kanjonu navzdol, uspeli deponirati v vodo pod slapom. Pri *Chryseobacterium*-u izstopata dva podatka, in sicer »Zrak 1« ter »Zrak 2«, kjer sta vrednosti razmeroma visoki in sicer 16 oziroma 13. To mogoče nakazuje na to, da ima ta bakterija razvite mehanizme za aktivno uporabo aerosolizacije. Pri marčevskem vzorčenju pri Kozjaku sta hipotezo potrdila *Flavobacterium* in *Janthinobacterium*, s skupnima vrednostma 31 in 8. Pri februarjem vzorčenju Parabole sorodne si vrste na vzorčnih mestih niso bile najdene, kar korelira z zelo nizkimi vrednostmi CFU in domnevami, ki opisujejo vzroke za takšno stanje. Primerjava med letnima časoma pri rodu *Flavobacterium* je pri obeh slapovih pokazala višje število izoliranih sevov pri majskem vzorčenju, kar korelira s kvantitativnimi rezultati. Opravili pa smo tudi primerjavo med Parabolom in Kozjakom in ugotovili, da je bil pri obeh slapovih maja 2009, *Flavobacterium* najden na vseh skupno osmih vzorčnih mestih, kar priča o veliki razširjenosti te bakterije v okolju. Pri spomladanskem in zimskem vzorčenju pri Kozjaku smo v primerjavi s Parabolom izolirali več sevov, kar prav tako korelira s kvantitativnimi rezultati.

### **5.1.3 Kemijsko-fizikalne analize**

#### **5.1.3.1 Kemijske analize**

Meritve koncentracij fosfatov in nitratov smo izvedli le ob majskem vzorčenju. Iskali smo potrditev domneve, da gre v obeh primerih za vodo, kjer ne bi smele biti prisotne povišane koncentracije, ki bi lahko preveč vplivale na samo koncentracijo bakterij ter vrstno sestavo.

##### **5.1.3.1.1 Parabola**

Koncentracija ortofosfata je bila 0,0035 mg/l. Zaloge fosforja v neonesnaženih celinskih vodah so nizke, saj fosfor večinoma izvira iz procesa preperevanja kamnin na površju, kar je počasen proces pa tudi na splošno je element redek (Moss, 2010). Dodaten razlog za nizke koncentracije je ta, da ga glineni delci v prsti dobro vežejo nase. Ker je zelo pomembna snov za primarne producente, ga ti aktivno veliko absorbirajo.

Koncentracija nitratov je bila 2,4 mg/l. V neonesnaženih vodah koncentracije ponavadi ne presegajo 1 mg/l, torej bi strogo gledano Parabola morala biti onesnažena. Vendar bi to višjo vrednost lahko pojasnili tudi s tem, da gre za vodotok, kjer primarnih producentov praktično ni, torej ni porabnikov nitratov. Kot že omenjeno, je prispevno območje Parabole zelo strma, 1000 metrov visoka stena, voda se steka po goli skali, torej je kemijska sestava vode močno odvisna od sestave padavin.

Vrednost pH je bila maja 7,5, februarja pa 8, kar je znotraj ranga večine neobremenjenih voda.

#### **5.1.3.1.2 Kozjak**

Koncentraciji ortofosfatov (0,036 mg/l) in nitratov (2,7 mg/l) sta bili pričakovano nekoliko višji kot pri Paraboli, vzrok je lahko v odpadnih vodah iz gospodinjstev, predvsem pa v izpiranju s travnikov, kjer se pase drobnica in govedo. Temu vprid kažeta tudi obe meritvi prevodnosti, ki sta za približno 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$  višji kot pri Paraboli.

Vrednost pH je bila pri obeh vzorčenjih 8,3, kar je znotraj ranga večine neobremenjenih voda. Rahlo višja vrednost kot pri Paraboli bi lahko izvirala iz vpliva odpadnih vod gospodinjstev.

#### **5.1.3.2 Fizikalne analize**

Pretoka, merjena pozimi, sta bila nižja kot spomladi. Pri Paraboli je bil februarja (0,075  $\text{m}^3/\text{s}$ ) za 21 % nižji kot maja (0,095  $\text{m}^3/\text{s}$ ), pri Kozjaku pa je bil nižji za 23 %.

Zračni pritisk ima, poleg drugih fizikalnih dejavnikov, vpliv na koncentracijo raztopljenega kisika ter na nasičenost vode s kisikom. Če primerjamo vrednosti zračnega pritiska in nasičenosti vode s kisikom, izmerjene pri Kozjaku maja in marca, med tema dvema parametroma obstaja korelacija; v primerjavi z majem je bila marčevska vrednost zračnega tlaka nižja, prav tako je marčevska vrednost nasičenosti vode s kisikom nižja od majske. Pri merjenju koncentracije raztopljenega kisika je ravno obratno. Možna razlaga tega je, da smo pri marčevskem vzorčenju prehitro prenehali z merjenjem s sondo. Pri



Paraboli sta vrednosti nasičenosti vode s kisikom enaki, koncentraciji raztopljenega kisika pa korelirata z vrednostnima zračnega tlaka.

## 5.2 Sklepi

- Gojišča z R2A so pokazala višje vrednosti CFU/ml in CFU/m<sup>3</sup> kot gojišča z NA.
- Vrednosti CFU/m<sup>3</sup> pri vzorčnih mestih »Zrak 1« in »Zrak 2« niso pri nobenem od slapov pokazale specifične tendence v razmerju koncentracij bakterij v zraku.
- Najpogostejši izmed bakterijskih skupin je bil rod *Flavobacterium*, ki je predstavljal kar 40,7 % vseh izoliranih sevov.
- Največje sposobnosti aerosolizacije sta imela *Flavobacterium* in *Pseudomonas*.

## 6 POVZETEK

Za številne mikroorganizme atmosfera predstavlja življenjski prostor, ki omogoča neomejene možnosti za razširjanje po planetu. To jim uspeva predvsem zaradi izkoriščanja vremenskih pojavov, kjer jih kot spore, ali pa vključene v aerosole, raznašajo vetrovi ali oblaki. Številne bakterije so prilagojene za preživetje v takih ekstremnih razmerah v atmosferi, kjer so sposobne tudi presnove in celo razmnoževanja.

Namen naše raziskave je bil potrditi hipotezo, da nekatere bakterije, vključene v dežne kaplje ali snežinke, zapustijo oblake in se deponirajo v gorah, od koder svojo pot navzdol nadaljujejo ulete v potokih. Ob prehodu potoka v slap pa lahko pride do ponovnega vstopa v atmosfero, saj jih ulete v aerosole naprej prenašajo vetrovi.

Terensko delo smo opravljali v Zgornjesoški dolini na slapu Kozjak, v katerega potok z istim imenom se izteka kanalizacija štirih manjših vasi ter na slapu Parabola potoka Fratarice, kjer ni neposrednega vpliva človeka. Opravili smo štiri terenska vzorčenja vode, snega ter zraka. To je bilo izvedeno dvakrat spomladi leta 2009 ter dvakrat pozimi leta 2010. Takšne termine smo si izbrali, ker smo predvidevali, da bo temperatura vode pomemben dejavnik pri pojavnosti bakterij, pozimi bolj, spomladi pa manj omejujoč. Pri Paraboli nas je najbolj zanimal vpliv taljenja spomladanskega snega na bakterijsko sestavo vode in aerosolov.

Zrak oziroma aerosole smo vzorčili z vzorčevalnikom zraka RCS High Flow, ki ob sesanju vnaprej določenega volumna na poseben trakasti nosilec hranilnega gojišča, enakomerno razporeja ulete delce. Povzorčeni staljeni sneg in vodo smo na gojišča nacepili takoj po prihodu v laboratorij. Uporabljali smo gojišči NA in R2A ter njuni redčeni različici 1/100 NA in 1/10 R2A. Poleg izolacije zraslih sevov za kvalitativne rezultate smo za ugotavljanje vplivov fizikalnih in kemijskih parametrov opravljali tudi štetje CFU.

Za potrditev domneve o ponovni aerosolizaciji bakterij smo iskali med seboj čimbolj sorodne predstavnike nekega rodu. To smo ugotavljali na podlagi izračuna evolucijske razdalje po Kimurini dvoparametrični metodi. Rezultat je bil v programu Mega 4 izrisano drevo, ki ga program ustvari na podlagi algoritmičnega združevanja sosedov, statistično relevantnost razcepišča smo preverili z metodo bootstrap s 1000 ponovitvami.

Rezultati CFU so pokazali, da je bilo v zimskih vzorcih pri obeh slapovih manj bakterij, kar je najverjetneje posledica nizke temperature vode, samo 0,7 °C pri Paraboli in 3,3 °C pri Kozjaku. Predvidevali smo, da bodo vrednosti CFU/m<sup>3</sup> na tistem vzorčnem mestu zraka, ki bo bolj oddaljeno od slapu, manjše, vendar ni bilo opaznejših razlik. Na gojiščih iz R2A je zraslo veliko več sevov kot na NA.

Izolirati nam je uspelo skupno 651 sevov iz 51 različnih rodov. Do nivoja rodu ni bilo mogoče določiti 22 sevov. Z 265 predstavnikami je bil najštevilčnejši rod *Flavobacterium*, kar 82,7 % znotraj phyluma *Bacteroidetes*, oziroma kar 40,7 % v primerjavi z vsemi rodovi iz ostalih phylumov. Od skupno 265 sevov, jih je bilo 65 % povzorčenih v zraku, kar bi lahko nakazovalo dobre aerosolizacijske sposobnosti te bakterije. Podobne lastnosti je kazal rod *Pseudomonas* iz phyluma *Gammaproteobacteria* s 149 sevi, od tega je bilo iz zraka izoliranih 64 sevov (43 %). Precej veliko število ga je bilo izoliranega iz majskega snega, kar nakazuje na možnosti, da se je ta rod sposoben v takih razmerah tudi razmnoževati.

Pri obeh slapovih so bili izolirani tudi rodovi enterobakterij *Serratia*, *Erwinia* in *Shigella*, ki so potencialno patogene Gram negativne bakterije. Kljub skromnemu številu vseh sevov prevladuje pojavnost pri Kozjaku. Njihov izvor bi najverjetneje bil izliv kanalizacije v potok ter izpiranje s pašnikov.

Pri Kozjaku smo v treh primerih uspeli iz vseh štirih vzorčnih mest izolirati predstavnike iste vrste. Ti so pripadali rodovom *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* (oba iz vzorčenja 15. 3. 2010) in *Pseudomonas*, iz vzorčenja dne 21. 5. 2009. Pri Paraboli pa je bil pogoj izpolnjen pri rodovih *Janthinobacterium* in *Pseudomonas*, v obeh primerih so bili izolati iz vzorčenja dne 11. 5. 2009. Sorodstveno drevo pa je pokazalo tudi, da so bili nekateri sevi *Flavobacteriuma* iz majskega vzorčenja prisotni tako v vseh vzorčnih mestih Parabole, kakor tudi Kozjaka.

## SUMMARY

For numerous types of microorganisms the atmosphere represents an environment that enables unrestricted possibilities for their dispersal around the planet. Various weather conditions can aid them or their spores to be included into aerosoles and then be carried around with winds or clouds. Many bacterial species have adapted to survive the extreme conditions in the atmosphere, they are even able to actively metabolise and even procreate.

The proposed hypothesis of our research was, that waterfall spray can enable bacteria to enter air phase again, after they have entered a mountain stream included into raindrops or snowflakes in the process of precipitation.

Field work took place in the Upper Soča valley, Slovenia, at the waterfalls Kozjak and Parabola. Kozjak, which is named the same as the creek, is influenced by sewage water coming from four villages and Parabola of the Fratarica stream, has no human influence. Field work was conducted four times, taking samples from the water, snow and air. Due to the assumption that water temperature would be a limiting factor in the concentrations of bacteria, we chose to take samples in the spring of 2009 and winter of 2010, being respectively less and more limiting. At Parabola, our main interest was the influence of the spring snowmelt on the bacterial flora in the water and aerosols.

Air/aerosols was sampled with a portable RCS High Flow microbial air sampler. Based on a preset volume it performed centrifugal impaction on a specially designed baking mold-like agar stripe, where vacuumed microorganisms get evenly distributed. Sampled snow and water were inoculated on agar plates as soon as we returned back to the laboratory. We used NA and R2A agars as well as their diluted versions, 1/100 NA and 1/10 R2A. Besides isolation of the grown strains for qualitative research purposes, we also conducted CFU count, to study the influence of physical and chemical parameters.

To confirm our hypothesis we had to look for strains of the same species. We achieved that with the use of evolutionary distance estimation for nucleic acid sequences, predicted by Kimura - two parameter model.

The CFU count showed lower numbers from the winter samples, which most likely is a consequence of low water temperature, only 0,7 °C at Parabola and 3,3 °C at Kozjak. We assumed lower CFU/m<sup>3</sup> values would occur from air sampling sites that were the farthest from the waterfall, but no such result was obtained. Much more strains would grow on R2A agar compared to NA.

In total, we managed to isolate 651 strains from 51 different genera, 22 strains were only possible to determine to family level. The most abundant of all was *Flavobacterium* with 265 strains, which is 82,7 % inside the phylum *Bacteroidetes* and 40,7 % comparing to the total number of isolates. 62 % of these strains were found in the air samples, which could prove good abilities of this genus to re-enter the air medium using aerosols or water droplets. Similar characteristics were found with *Pseudomonas* from phylum *Gammaproteobacteria*, where 64 out of 149 strains were attributed to the air samples (43 %). Relatively high numbers of this genus were also found in the spring snow samples, which might classify it to those bacterial species that have the ability to survive and even procreate in the snow.

At both waterfalls we were able to isolate 3 genera of the *Enterobacteriaceae* family, *Serratia*, *Erwinia* and *Shigella*, which are Gram negative potentially pathogenic bacteria. Even though the number of the strains is small, the majority were from Kozjak, which means their origin was most likely sewage water and pastures.

At Kozjak we successfully attributed 3 bacterial species to all the four sampling sites; these were genera *Janthinobacterium*, *Flavobacterium* (both from field work conducted on the 15<sup>th</sup> of March 2010) and *Pseudomonas*, from the 21<sup>st</sup> of May 2009. At Parabola, genera *Janthinobacterium* and *Pseudomonas* from the 11<sup>th</sup> of May 2009, were also found at all sampling sites. We were also successful in finding a common species from both waterfalls, attributed to genus *Flavobacterium*.

## 7 VIRI

- Alfreider A., Pernthaler J., Amann R., Sattler B., Glöckner F. O., Wille A., Psenner R. 1996. Community analysis of the bacteria assemblages in winter cover and pelagic layers of a high mountain lake using in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2138–2144
- Aller J. Y., Kuznetsova M. R., Jahns C. J., Kemp P. F. 2005. The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. *J. Aerosol. Sci.*, 36: 801–812
- Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A. M. 2005. Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of the clouds. *Atmos. Environ.*, 39: 4143–4153
- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A. M. 2007a. Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dôme: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59: 242–254
- Amato P., Parazols M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G., Delort A. M. 2007b. An important oceanic source of microorganisms for cloud water at the Puy de Dôme. *Atmos. Environ.*, 41: 8253–8263
- Angenent L. T., Kelley S. T., St. Amand A., Pace N. R., Hernandez M. T. 2005. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 13: 4860–5
- Ariya P. A., Nepotchatykh O., Igtova O., Amyot M. 2002. Microbiological degradation of organic compounds in the atmosphere, *Geophys. Res. Lett.*, 29: 341–344

- Ariya P. A., Amyot M. 2004. New directions: the role of bioaerosols in atmospheric chemistry and physics. *Atmos. Environ.*, 38: 1231–1232
- Bauer H., Kasper-Giebl A., Löflund M., Giebl H., Hitenberger R., Zibuschka F., Puxbaum H. 2002. The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmos. Res.*, 64: 109–119
- Burrows S. M., Butler T., Jöckel P., Tost H., Kerckweg A., Pöschl U., Lawrence M. G. 2009. Bacteria in the global atmosphere – Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmos. Chem. Phys.*, 9: 9281–9297
- Burger S. R., Bennett J. W., 1985. Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marscescens*: possible selective function for prodigiosin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 487–490
- Castello J. D., Lakshman D. K., Tavantzis S. M., Rogers S. O., Bachand G. D., Jagels R., Carlisle J., and Liu Y. 1995. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology*, 85: 1409–1412
- Calderon C., Lacey J., McCartney A., Rosas I. 1997. Influence of urban climate upon distribution of airborne Deuteromycete spore concentrations in Mexico City. *Int. J. Biometeorol.*, 40: 71–80
- Capanna E. 1999. Lazzaro Spallanzani: At the roots of modern biology. *J. Exp. Zool.*, 285: 178–196
- Christner B. C., Mosley-Thompson E., Thompson L. G., Zagorodnoc V., Sandman K., Reeve J. N. 2000. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus*, 144: 479–485
- Cochet N., Widehem P. 2000. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 153–161

- Cote V., Kos G., Ariya P. A. 2008. Microbial and de novo transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Penicillium chrysogenum*, *Sci. Total Environ.*, 390: 530–537
- Després V. R., Nowoisky J. F., Klose M., Conrad R., Andreae M. O., Pöschl U. 2007. Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. *Biogeosciences*, 4: 1127–1141
- De Angelis M., Gaudichet A. 1991. Saharan dust deposition over Mont Blanc (French Alps) during the last 30 years. *Tellus*, 43B: 61–75
- Dimmick R. L., Wolochow H., Chatigny M. A. 1979. Evidence that bacteria can form new cells in airborne particles. *Appl. Environ. Microb.*, 37: 924–927
- Ebner M. R., Haselwandter K., Frank A. 1989. Seasonal fluctuations of airborne fungal allergens. *Mycol. Res.*, 92: 170–176
- Ehrenberg C. G. 1849. Passatstaub und Blutregen, *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, 269–460
- Elster J., Benson E. E. 2004. Life in the Polar Terrestrial Environment: A focus on algae, in life in the frozen state. Fuller B. Lane N., Benson E. E. (ed.), London: Taylor and Francis, 111–149
- Flechtner V. R. 1999. Enigmatic desert soil algae. Soil algal flora of the Western USA and Baja California, Mexico, in *enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic Publishers, 231–241
- Foght J., Aislabie J., Turner S., Brown C. E., Ryburn J., Saul D. J., Lawson W. 2004. Culturable bacteria in subglacial sediments and ice from two southern hemisphere glaciers. *Microb. Ecol.* 47: 329–340



- Fong N. J., Burgess M. L., Barrow K. D., Glenn D. R. 2001. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 750–756
- Fuzzi, S., Mandrioli, P., Perfetto, A. 1997. Fog droplets – An atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmos. Environ.*, 31: 287–290
- Garty. J. 1999. Lithobionts in the Eastern Mediterranean: Enigmatic microorganisms and life in extreme environments. Kluwer Academic Publishers, 255–276
- Gislén T. 1948. Aerial plankton and its conditions of life. *Biological Reviews*, 23: 109–126
- González-Toril E., Amils R., Delmas R. J., Petit J. R., Komárek J., Elster J. 2009. Bacterial diversity of autotrophic enriched cultures from remote, glacial Antarctic, Alpine and Andean aerosol, snow and soil samples. *Biogeosciences*, 6: 33–44
- Gregory P. H. 1961. *The Microbiology of the atmosphere*. Interscience Publishers Inc., New York
- Gregory P. H. 1967. Atmospheric microbial cloud systems. *Science Progress*, Oxford, 55: 613–628
- Gregory P. 1971. The Leeuwenhoek lecture: Airborne microbes: their significance and distribution. *Soc. Biol. Sci.*, 177: 469–483
- Griffin D. W., Westphal D. L., Gray M. A. 2006. Airborne microorganisms in the African desert dust corridor over the mid-Atlantic ridge. *Aerobiologia*, 22: 211–226
- Grimont F., Grimont P. A. D. 2006. The genus *Serratia*. *Prokaryotes*, 6: 219–244
- Hamilton W. D., Lenton T. M. 1998. Spora and Gaia: how microbes fly with their clouds., *Ethol. Ecol. Evol.*, 10: 1–16

- Hasnain S. M., Fatima K., Al-Frayh A., Al-Sedairy S. T. 2005. One-year pollen and spore calendars of Saudi Arabia: Al-Khobar Abha and Hofuf. *Aerobiologia*, 21: 241–247
- Huang C. Y., Lee C. C., Li F. C., Ma Y. P., Su H. J. J. 2002. The seasonal distribution of bioaerosols in municipal landfill sites: a 3-year study. *Atmos. Environ.*, 36, 27: 4385–95
- Hughes K. A. 2003. Aerial dispersal and survival of sewage-derived faecal coliforms in Antarctica. *Atmos. Environ.*, 37: 3147–3155
- Imshenetskii A. A., Lysenko S. V., Kazakov G. A. 1978. Upper boundary to the biosphere. *Appl. Environ. Microb.*, 35: 1–5
- Isard S. A., Gage S. H., Comtois P., Russo J. M. 2005. Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *Bioscience*, 55: 851–861
- Jones A. M., Harrison R. M. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Sci. Total Environ.*, 326: 151–180
- Kasprzyk I., Worek M. 2006. Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland. *Aerobiologia*, 22: 169–176
- Kellogg C. A., Griffin D. W. 2006. Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol. Evol.*, 21: 638–644
- Klironomos J. N., Rillig M. C., Allen M. F., Zak D. R., Pregitzer K. S., Kubiske M. E. 1997. Increased levels of airborne fungal spores in response to *Populus tremuloides* grown under elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Can. J. Bot.*, 75: 1670–1673
- Krumbein W. E. 1995. Gone with the wind – a second blow against spontaneous generation. In memoriam, Christian Gottfried Ehrenberg (1795–1876). *Aerobiologia*, 11: 205–211

- Leach C. 1987. Diurnal electrical potentials of plant leaves under natural conditions. *Environ. Exp. Bot.*, 27: 419–430
- Leck C., Bigg K. 2005. Biogenic particles in the surface microlayer and overlaying atmosphere in the central Arctic Ocean during summer. *Tellus*, 57B: 305–316
- Levetin E., Dorsey K. 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia*, 22, 1: 3–12
- Lighthart B., Shaffer B. 1995. Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4: 1492–6
- Lighthart B. 1997. The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23: 263–274
- Lighthart B. 1999. An hypothesis describing the general temporal and spatial distribution of alfresco bacteria in the Earth's atmospheric surface layer. *Atmos. Environ.* 33: 611–615
- Mandrioli P., Puppi G. L., Bagni. N. 1973. Distribution of microorganisms in hailstones. *Nature*, 246: 416–417
- Marshall W. A. 1996a. Aerial dispersal of lichens soredia in the maritime Antarctic. *New Phytologist*, 134: 523–530
- Marshall W. A. 1996b. Biological particles over Antarctica. *Nature*, 383: 680
- McKenzie E. H. C. 1998. Rust fungi of New Zealand – an introduction and list of recorded species. *New Zeal. J. Bot.*, 36: 233–271
- Mitakakis T. Z., Clift A., McGee P. A. 2001. The effect of local cropping activities and weather on the airborne concentration of allergenic *Alternaria* spores in rural Australia. *Grana*, 40: 230–239

- Moletta-Denat M., Bru-Adan V., Delgenes J. P., Hamelin J., Wéry N., Godon J. J. 2010. Selective microbial aerosolization in biogas demonstrated by quantitative PCR. *Bioresource Technology*, 101: 7252–7257
- Morris C. E., Monier J. M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 41: 429–453
- Morris C. E., Georgakopoulos D. G., Sands D. C. 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV*, 121: 87–103
- Morris C. E., Sands D. C., Bardin M., Jaenicke R., Vogel B., Leyronas C., Ariya P. A., Psenner R. 2011. Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne microorganisms on the atmosphere and climate. *Biogeosciences*, 8: 17–25
- Moss B. 2010. *Ecology of freshwaters. A view for the twenty-first century*. Fourth edition. Wiley-Blackwell, str. 43
- Mount D. W. 2004. *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. CSHL Press, str. 122
- Pasteur L. 1860a. Expériences relatives aux générations dites spontanées, *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Acad'emie des sciences*, 50: 303–307
- Pasteur L. 1860b. Suite à une précédente communication relative aux générations dites spontanées. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Acad'emie des sciences*, 51: 675–678
- Pearce D. A., Bridge P. D., Hughes K. A., Sattler B., Psenner R., Russell N. J. 2009. Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 69: 143–157

- Peccia J., Hernandez M. 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmos. Environ.*, 40: 3941–3961
- Prospero J. M., Blades E., Mathison G. Naidu R. 2005. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 21: 1–19
- Richards B. 1979. Navy Fogged Bay Area With Bacteria; Navy Ship 'Attacked' Bay Area With Bacteria Laden Smog in '50". *The Washington Post* (Final ed.), pp. A1
- Rossi V., Bugiani R., Giosue S., Natali P. 2005. Patterns of airborne conidia of *Stemphylium vesicarium* the causal agent of brown spot disease of pears in relation to weather conditions. *Aerobiologia*, 21: 203–216
- Sattler B., Puxbaum H., Psenner R. 2001. Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophys. Res. Lett.*, 28: 239–242
- Schnell R. C., Vali G. 1972. Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature*, 236: 163–165
- Shinn E. A., Griffin D. W., Seba D. B. 2003. Atmospheric transport of mold spores in clouds of desert dust. *Arch. Environ. Health*, 58, 8: 498–504
- Starliper C. E., 2011. Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of advanced research*, 2: 97–108
- Stennett P. J., Beggs P. J., 2004. *Alternaria* spores in the atmosphere of Sydney Australia and relationships with meteorological factors. *Int. J. Biometeorol.*, 49: 98–105
- Suzuki K., Sasaki J., Uramoto M., Nakase T., Komagata K. 1997. *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an obligately psychrophilic

actinomycete to accommodate "*Curtobacterium psychrophilum*" Inoue and Komagata 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 474–478

Szyrmer W., Zawadzki I. 1997. Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review. *Bull. Am. Meteorol. Soc.*, 78: 209–228

Tong Y., Lighthart B. 2000. The annual bacterial particle concentration and size distribution in the ambient atmosphere in a rural area of the Willamette Valley, Oregon. *Aerosol Sci. Tech.*, 32: 393–403

Tringe, S. G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W. H., Yap, J., Yao, F., Suan, S. T., Ing, S. K., Haynes, M., Rohwer, F., Wei, C. L., Tan, P., Bristow, J., Rubin, E. M., Ruan, Y., 2008. The airborne metagenome in an indoor urban environment. *PLoS One* 3, e1862

Urbanič G., M. J. Toman, 2002. Varstvo celinskih voda. Založba Scripta, Ljubljana, str. 37–42

Van Thielen N., Garbary D. J. 1999. Life in the rocks – endolithic algae, in *Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*. Kluwer Academic Publishers, 243–253

Vincent W. F. 2000. Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism, *Antarctic Science*, 12, 3: 374–385

Wainwright M., Wickramasinghe N. C., Narlikar J. V., Rajaratnam P. 2003. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, 1: 161–5

