

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Andraž GODICELJ

**VPLIV PROSTIH NUKLEINSKIH KISLIN NA ZAZNAVANJE  
STRUKTURE IN AKTIVNOSTI MIKROBNIH ZDRUŽB**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**EFFECT OF FREE NUCLEIC ACIDS ON DETECTION OF  
STRUCTURE AND ACTIVITY IN MICROBIAL COMMUNITIES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomske naloge imenovala doc. dr. Blaž Stresa, za recenzenta pa doc. dr. Tomaž Accetta.

Mentor: doc. dr. Blaž Stres

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Blaž Stres

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Tomaž Accetto

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je last lastnega raziskovalnega dela.

Andraž Godicelj

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.26+579.8:631.461:577.2.08(043)=163.6
- KG mikrobiologija tal/tla/mikrobne združbe/razgradnja DNK/aktivnost mikrobne združbe/pestrost mikrobne združbe/fizikalno-kemijske lastnosti tal/molekularne tehnike/PCR/T-RFLP
- AV GODICELJ, Andraž
- SA STRES, Blaž (mentor)/ ACCETTO, Tomaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2011
- IN VPLIV PROSTIH NUKLEINSKIH KISLIN NA ZAZNAVANJE STRUKTURE IN AKTIVNOSTI MIKROBNIH ZDRUŽB
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIII, 76 str., 1 pregl., 20 sl., 6 pril., 106 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Tla prekrivajo približno 30 % zemeljskega površja in predstavljajo vir hranil za organizme na kopnem. V tleh najdemo ogromno različnih mikroorganizmov, ki lahko s svojo aktivnostjo bistveno pripomorejo k boljši kvaliteti zemlje. Proučevali smo osnovne značilnosti obdelovanih tal in analizirali vpliv razgradnje prostih nukleinskih kislin na tipizacijo bakterijske mikrobne združbe ter njihovo aktivnost. Vzorčili smo v mesecu aprilu 2009 ter vzorce hranili na 4 °C. Ugotovili smo osnovne značilnosti tal, nato pa vzorce razdelili v dve seriji, in sicer COZ (cikel zmrzovanja in odtaljevanja) in 4 °C, nekaterim vzorcem pa smo dodali še DNK in jih inkubirali 17 dni. Vmes smo na nekaj dni vzorce analizirali. Ugotavljali smo bakterijsko aktivnost merjeno z reagentom FDA ter naredili direktno izolacijo DNK. 16S rDNK smo nato pomnoževali s PCR in naredili T-RFLP analizo. Ugotovili smo, da je pH tal nevtralen in da so vse ostale značilnosti primerljive z ugotovitvami podobnih raziskav. Mikrobna aktivnost je bila povišana pri vzorcih, kjer smo dodali DNK in hkrati inkubirali po metodi COZ. Ugotovili smo tudi, da čas, dodana DNK in različne temperature ne vplivajo na sestavo bakterijske mikrobne združbe, da pa se ta razlikuje od mikrobne združbe, ki smo jo vzgojili v LB gojišču.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn
- DC UDC 579.26+579.8:631.461:577.2.08(043)=163.6
- CX soil microbiology/soil/microbial communities/DNA degradation/activity of microbial communities/diversity of microbial communities/physico-chemical properties of soil/molecular techniques/PCR/T-RFLP
- AU GODICELJ, Andraž
- AA STRES, Blaž (supervisor)/ ACCETTO, Tomaž (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2011
- TI EFFECT OF FREE NUCLEIC ACIDS ON DETECTION OF STRUCTURE AND ACTIVITY IN MICROBIAL COMMUNITIES
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XIII, 76 p., 1 tab., 20 fig., 6 ann., 106 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Soil covers about 30 % of the Earth's surface and represents a source of nutrients for all terrestrial life. A huge variety and activity of micro-organisms found in the soil can make a significant contribution to the improvement of soil's quality. We studied the basic characteristics of processed soil and analyzed the effect of decomposition of free nucleic acids on typification of bacterial microbial community and their activity. The samples were collected in April and then stored at 4 °C. We discovered the basic characteristics of the soil, and then labeled it in the two series, namely the COZ (freeze- thaw cycle) and 4 °C, DNA was added to some samples and incubated for 17 days. In the meantime, every few days, the samples were analyzed. We determined the bacterial activity as measured by the FDA reagent and made a direct isolation of the DNA. 16S rDNK was then multiplied with PCR and an analysis of T-RFLP was made. We discovered that soil's pH is neutral and that all other characteristics are comparable to the findings of similar research. Microbial activity showed increased activity in the samples with the addition of DNA and incubated after COZ method. We have also discovered that time, added DNA and different temperatures do not affect the composition of bacterial microbial community, but it differs from the microbial communities that we bred in the LB farm.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
KAZALO PRILOG .....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN HIPOTEZA.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>5</b>
2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI TAL.....	5
2.2 TALNI MIKROORGANIZMI.....	6
2.3 VSTOP DNK V TLA .....	7
2.4 OBSTOJNOST NUKLEINSKIH KISLIN V TLEH.....	9
2.5 KROŽENJE DNK V TLEH .....	10
2.6 GENSKA TRANSFORMACIJA DNK V BAKTERIJSKI MIKROBNI ZDRUŽBI.....	10
2.7 RAZGRADNJA DNK V TLEH.....	11
2.8 RAZTOPLJEN ORGANSKI OGLJIK.....	12
2.9 MIKROBNA AKTIVNOST PRI NIZKIH TEMPERATURAH.....	12
2.10 UČINKI CIKLOV ODTALJEVANJA IN ZAMRZOVANJA (COZ) .....	14
2.11 ODPRTA VPRAŠANJA, IZZIVI .....	16
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 SHEMA EKSPERIMENTA.....	17
3.2 VZORČENJE .....	18
3.3 PRIPRAVA MIKROKOZMOV.....	18

3.4	OSNOVNE ZNAČILNOSTI TAL.....	21
3.4.1	pH tal .....	21
3.4.2	Vlažnost tal .....	21
3.4.3	Tekstura tal .....	21
3.4.4	Ugotavljanje koncentracije raztopljenega organskega ogljika v tleh .....	23
3.4.5	Ugotavljanje vsebnosti redukcijskih sladkorjev v tleh .....	25
3.4.6	Ugotavljanje velikosti molekul v vodi topnih organskih snovi.....	26
3.4.7	Umestitev fizikalno-kemijskih lastnosti preučevanih tal v primerjavi z drugimi tlemi .....	27
3.5	MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE S FLUORESCEIN DIACETATOM.....	28
3.6	TIPIZACIJA BAKTERIJSKE MIKROBNE ZDRUŽBE.....	30
3.6.1	Priprava biomase gojene frakcije bakterij .....	30
3.6.2	Izolacija skupne mikrobne DNK gojene frakcije bakterij.....	30
3.6.3	Izolacija skupne mikrobne DNK iz tal .....	30
3.6.4	Merjenje koncentracije DNK.....	31
3.6.5	Verižna reakcija s polimerazo .....	31
3.6.6	Optimizacija reakcije PCR .....	32
3.6.7	Čiščenje produktov PCR .....	32
3.6.8	Restrikcija z endonukleazo <i>HaeIII</i> .....	33
3.6.9	Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih odsekov s kapilarno elektroforezo ABI 3130XL.....	33
3.6.10	Analiza kromatogramov .....	33
3.7	MATERIALI .....	35
3.7.1	Reagenti .....	35
3.7.2	Kompleti .....	36
3.7.3	Encimi.....	36
3.7.4	Pufri in raztopine .....	36
3.7.5	Začetni oligonukleotidi.....	37
3.7.6	Gojišča.....	37

4	<b>REZULTATI</b> .....	38
4.1	ZNAČILNOSTI EKSPERIMENTALNIH TAL IN PRIMERJAVA Z DRUGIMI TLEMI.....	38
4.1.1	Osnovne fizikalno-kemijske lastnosti proučevanih tal.....	38
4.1.2	Umestitev fizikalno-kemijskih lastnosti proučevanih tal v primerjavi z drugimi tlemi .....	39
4.2	EKSPERIMENT.....	41
4.2.1	Spreminjanje velikosti molekul v vodi topne organske snovi v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO <sub>2</sub> ) in prisotnosti/odsotnosti zunajcelične DNK.....	42
4.2.2	Aktivnost mikrobne združbe (FDA) v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO <sub>2</sub> ) in prisotnosti/odsotnosti zunajcelične DNK.....	43
4.3	TIPIZACIJA BAKTERIJSKE MIKROBNE ZDRUŽBE.....	46
5	<b>SKLEPI</b> .....	49
6	<b>RAZPRAVA</b> .....	50
7	<b>VIRI</b> .....	54
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematičen prikaz tehnike T-RFLP pri tipizaciji genov za 16S rRNA združbe (Grüntzig in sod., 2006).....	2
Sl. 2: Odnos med številom bakterijskih celic v himalajskem sedimentu (direktnim štetjem pod mikroskopom) ter koncentracijo DNK ekstrahirano iz okolja .....	13
Sl. 3: Shema poteka poskusa .....	17
Sl. 4: Satelitski posnetek mesta vzorčenja na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete (Google maps, 2010) .....	18
Sl. 5: Povprečne dnevne temperature tal (°C) v globini -5 cm skozi leto na merilni postaji Ljubljana (ARSO, 2002: 4) .....	19
Sl. 6: Nihanje temperatur tal na globini -5 cm v mesecih januar in februar (A), december (B) in povprečne mesečne temperature tal (°C) po različnih globinah v cm merilne postaje LJ- Bežigrad (C) (ARSO, 2002: 11) .....	20
Sl. 7: Teksturni trikotnik (Zupan in sod., 1998) .....	23
Sl. 8: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij glukoze za določanje koncentracije raztopljenih organske snovi v hladnih ekstraktih tal s tehniko KPK .....	24
Sl. 9: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij glukoze za ugotavljanje koncentracije reduktivnih sladkorjev v hladnih ekstraktih tal s tehniko PAHBAH. ....	25
Sl. 10: Izsek iz urejenih podatkov lastnosti tal v programu PAST .....	27
Sl. 11: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij fluoresceina za merjenje aktivnosti mikrobne združbe. ....	29
Sl. 12: Fluorescein diacetat (FDA) (Sigma Aldrich, 2010).....	29
Sl. 13: Ordinacija z NM-MDS osnovnih fizikalno- kemijskih lastnosti tal (Priloga A). ....	39
Sl. 14: Primerjave treh skupin tipov tal (hladna, ekvatorialna, srednje evropska).. .....	40
Sl. 15: Spreminjanje indeksa molekulske mase v vodi raztopljenih organskih snovi v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO <sub>2</sub> ) ter dodajanja zunajcelične DNK.. ...	42
Sl. 16: Shematski prikaz večanja molekulske mase v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO <sub>2</sub> ) ter dodajanja zunajcelične DNK .....	43
Sl. 17: Mikrobna aktivnost v tleh merjena s hidrolizo fluorescein diacetata (FDA) pri različnih pogojih inkubacije (4 °C, CO <sub>2</sub> , brez dodane DNK, z dodano DNK) (A) in	



relativne mikrobne aktivnosti normirane na aktivnost izmerjeno za vzorce inkubirane pri 4 °C brez dodane DNK (B). .....	45
Sl. 18: Podobnost mikrobnih združb v tleh, ki so bila izpostavljena različnim pogojem inkubacije (4 °C ali CO <sub>2</sub> ) in dodatkom DNK iz tal (DNK izolirana iz gojene frakcije).....	46
Sl. 19: Podroben prikaz podobnosti mikrobnih združb vseh vzorcev (iz Slika 18) .....	47
Sl. 20: Insert iz celokupnega dendrograma izoliranih mikrobnih združb, ki kaže, kako podobne so si zaznane mikrobne združbe z dodano DNK ali brez nje, CO <sub>2</sub> ali inkubacijo pri 4 °C (Tamura in sod., 2007).....	48

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Izmerjene fizikalno-kemijske lastnosti tal v treh neodvisnih ponovitvah.....	38
--	----

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Fizikalno-kemijske lastnosti različnih tal

Priloga B: Preglednica različno tretiranih vzorcev uporabljenih v raziskavi

Priloga C: Rezultati merjenja aktivnosti mikrobnih združb s FDA za vzorce inkubirane po COZ in izračun koncentracije fluoresceina.

Priloga D: Rezultati merjenja aktivnosti mikrobnih združb s FDA za vzorce inkubirane pri 4 °C in izračun koncentracije fluoresceina.

Priloga E: Rezultati merjenja velikosti delcev za vzorce inkubirane po COZ in izračun indeksa molekulske mase.

Priloga F: Rezultati merjenja velikosti delcev za vzorce inkubirane pri 4 °C in izračun indeksa molekulske mase.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
BPK	biološka potreba po kisiku
C	koncentracija
CE	centralno-evropska tla
COZ	cikli odtaljevanja in zmrzovanja
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOC	raztopljen organski ogljik (dissolved organic carbon)
DOM	raztopljena organska snov (dissolved organic matter)
FDA	fluorescein diacetat
FM	fini melj
FP	fini pesek
FTC	freeze-thaw cycle (cikel odtaljevanja in zmrzovanje)
G	glina
GM	grobi melj
GP	grobi pesek
KPK	kemijska potreba po kisiku
M	melj
MWI	molecular weight index (indeks molekulske mase)
NB	nutrient broth
P	pesek
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PLFA	fosfolipidne maščobne kisline (phospholipid fatty acid)
POC	neraztopljen organski ogljik
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kislina
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
TC	celotni ogljik (total carbon)
TIC	celotni anorganski ogljik (total inorganic carbon)
TOC	celotni organski ogljik (total organic carbon)

UV ultravijolična svetloba

V vzorec

VOC hlapljiv organski ogljik (volatile organic carbon)

## 1 UVOD

Tla so izjemno kompleksen in dinamičen ekosistem, ki ga sestavljajo anorganski mineralni delci, razkrajajoč se organski material ter živi organizmi (Atlas in Bartha, 1993). V tleh potekajo tudi kemijske reakcije med elementi, odgovorna so za kvaliteto podtalnice, prisotnost hlapljivih elementov v atmosferi, vplivajo pa tudi na zdravje rastlin in živali. (Verstraete in Mertens, 2004). Celotno kmetijstvo je odvisno od aktivnosti mikrobov, prav tako pa mikrobi igrajo glavno vlogo pri kroženju hranil v rastlinskem prehranjevalnem spletu, še posebej tisti, ki vsebujejo encime za pretvorbe ogljikovih, dušikovih in žveplovih spojin. Mikrobi v tleh in vodi pretvorijo te spojine do oblik, ki so dostopne rastlinam. Lahko pa mikrobi povzročajo tudi negativne učinke na zdravje rastlin in živali (Madigan in Martinko, 2006).

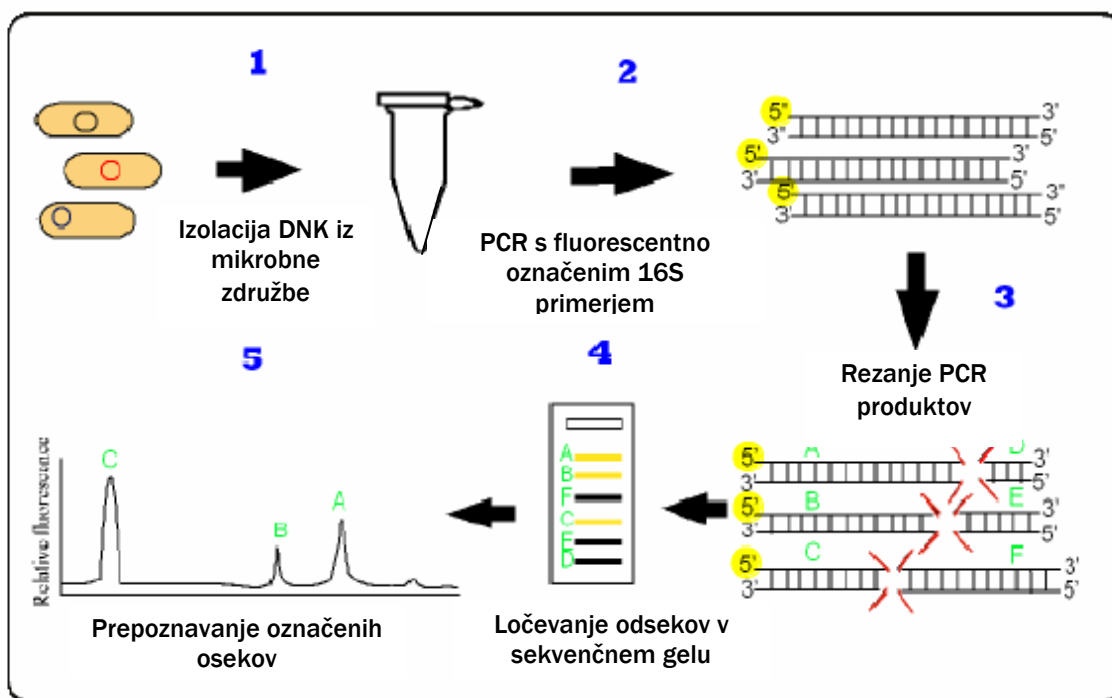
Vendar v obsežnih raziskavah mikrobnih združb z različnimi molekularnimi metodami do sedaj niso podrobno preučevali, kako temperatura vpliva na naše zaznavanje mikrobnih združb s temi tehnikami. Preučevanje tal z mikrobno DNK, ki predstavlja prosto DNK v naravi in zamrzovanje ter odtaljevanje vzorcev v primerjavi z vzorci tal pri konstantnih 4 °C, bo pokazalo vlogo temperaturnega nihanja preko zmrzišča na mikrobno aktivnost in pestrost mikrobnih združb v tleh. Glede na to, da so to temperature pri katerih živijo mikrobne združbe večji del leta, bodo prevladovale predvsem bakterije, ki so prilagojene na takšne razmere v okolju.

Gulden in sod. (2005) so ugotovili, da se razgradnja DNK precej upočasni v zamrznjenih tleh. Kljub temu nekaj raziskovalcev domneva, da se proces razgradnje neha pri 0 °C, Henriksen in Breland (1999) pa sta našla znatno mikrobno aktivnost pri 0 °C in manj, Diaz-Ravina in sod. (1994) so ugotovili, da je minimalna temperatura mikrobne razgradnje DNK povezana z najnižjo temperaturo, pri kateri lahko bakterije izločajo timidin iz zamrznjenih tal (-8,4 °C).

Pri temperaturah nižjih od 0 °C se v tleh zgodi marsikaj. Nastanejo kristali vode, ki pripomorejo k pokanju celic. Stres in sod. (2010) so ugotovili, da se število živih

bakterijskih celic zmanjša od 45- 48 %. Posledica je sprememba aktivnosti, sprememba koncentracije različnih celičnih nutrientov ter pokanje agregatov, kar pa znova povzroči sproščanje celičnih vsebin v okolje.

Vzorec tal smo odvzeli meseca aprila 2009 na eksperimentalnem polju pri Biotehniški fakulteti. Ugotavljali smo aktivnost in strukturo mikrobnje združbe v odvisnosti od inkubacije pri 4 °C, ciklov odtaljevanja in zmrzovanja ter prisotnosti DNK, ki ustreza lizi 64 % prisotne bakterijske biomase (Bakken in Olsen, 1989). Ker klasične mikrobiološke metode, ki temeljijo na gojenju mikroorganizmov za to niso prišle v poštev (Amman in sod., 1995), smo določanje strukture mikrobnje združbe uporabili tehniko imenovano T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism).



Slika 1: Shematičen prikaz tehnike T-RFLP pri tipizaciji genov za 16S rRNA združbe (Grüntzig in sod., 2006).

Tehnika T-RFLP temelji na direktni izolaciji DNK iz tal, pomnoževanju gena 16S rRNK v reakciji PCR (polymerase chain reaction) s fluorescentno označenimi začetnimi

oligonukleotidi, razrezu teh pomnožkov z encimi restrikcijskimi endonukleazami in analizi nastalih fragmentov s kapilarno elektroforezo.

Aktivnost mikrobne združbe smo merili preko razgradnje fluorescein diacetata (FDA), kjer iz brezbarvnega fluorescein diacetata nastanejo rumeno obarvani produkti.

Ugotavljali smo osnovne fizikalno-kemijske lastnosti tal, kot so pH, vlažnost, tekstura, raztopljeni organski ogljik (KPK - kemijska potreba po kisiku), skupna koncentracija redukativnih sladkorjev in razmerje absorbanc DOC. Prekrivajoče se podatke o osnovnih fizikalno-kemijskih lastnosti smo medsebojno primerjali z že objavljenimi podatki iz literature, da bi ugotovili, kako podobna so naša tla ostalim, že predhodno preučevanim tlem.

Z eksperimentom smo ugotavljali vpliv nihanja temperature preko zmrzišča na strukturo in aktivnost mikrobnih združb; kot kontrola so nam služila tla pri 4 °C. Znano je, da rast kristalov vode poškoduje vaj 50 % celic, zaradi česar se v okolje sprosti njihova DNK (Stres in sod., 2010), kar vpliva na signal, ki ga z molekularnimi tehnikami vidimo.

## 1.1 NAMEN IN HIPOTEZA

### NAMEN

Namen našega dela je bilo ugotavljanje vpliva proste DNK, ki bi predstavljala 64 % prisotne mikrobne združbe, na naše zaznavanje strukture mikrobne združbe ter njeno aktivnost v mineralnih tleh. Uporabili smo realni primer – nihanje temperature preko zmrzišča, kar povzroči cikle odtaljevanja in zmrzovanja tal. S tehniko merjenja hidrolize fluorescein diacetata smo želeli prikazati spreminjanje aktivnosti mikrobne združbe glede na čas, pogoje inkubacije (4 °C ali CO<sub>2</sub>) ter prisotnost/odsotnost ekstracelularne DNK.



Prav tako smo s tehniko T-RFLP želeli ugotoviti, ali se signal strukture mikrobne združbe, ki ga v takih pogojih vidimo, spreminja v odvisnosti od proučevanih parametrov.

Da bi naše ugotovitve umestili širše, smo izmerili osnovne fizikalno-kemijske lastnosti tal in jih primerjali z velikim številom vzorcev tal iz srednje Evrope, hladnih in ekstremnih okolij ter ekvatorialnih vzorcev tal.

## HIPOTEZA

1. Ho: Predvidevamo, da nihanje temperature preko zmrzišča in prisotnost zunajcelične DNK ne vplivata na strukturo in aktivnost mikrobne združbe v tleh.
2. Ho: Predvidevamo, da se eksperimentalna tla po svojih osnovnih-fizikalno kemijskih lastnostih ne ločijo signifikantno od drugih obdelovanih tal srednje Evrope in ekstremnih okolij.
3. Ho: Predvidevamo, da se struktura mikrobne združbe različno inkubiranih tal (i) in gojene frakcije mikrobne združbe (ii) ne bosta signifikantno razlikovala, prav tako pa bosta zelo podobna signalu mešanice DNK (i+ii).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OSNOVNE ZNAČILNOSTI TAL

Tla so kompleksen in dinamičen ekosistem. Sestavljena so iz anorganskih mineralnih delcev, razkrajajočega se organskega materiala in živih organizmov (Atlas in Bartha, 1993). Tla so "zavetnik življenja" in določajo kroženje elementov, kvaliteto podtalnice, prisotnost hlapljivih elementov v atmosferi, prav tako pa je od njih odvisno zdravje rastlin in živali. (Verstraete in Mertens, 2004). Fizikalne in kemične lastnosti tal vplivajo na prezračevanje, dostopnost hranil, zadrževanje vode in tako biološko aktivnost kot odnose med organizmi v tleh. Najpomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti so velikost delcev, poroznost, vlažnost, stopnja prezračevanja, kemijska sestava, delež glin, obseg kationsko izmenjevalne kapacitete in delež organske frakcije tal. Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na nastanek tal so matična podlaga, podnebje, biološka aktivnost, topografija pokrajine in čas. Ločimo organska in mineralna tla. Organska vsebujejo najmanj 20 % organskega ogljika, mineralna pa manj (Sylvia in sod., 1999). Tekstura mineralnih tal je opredeljena z velikostjo anorganskih delcev. Osnovne skupine so pesek (premer 0,05-2,0 mm), melj (premer 0,002-0,5 mm) in glina (premer manj kot 0,002 mm). Tekstura je osnovna lastnost tal in se ne spremeni v kratkem časovnem obdobju. (Sylvia in sod., 1999). Skoraj vsaka kemijska transformacija v tleh vključuje aktivno sodelovanje mikroorganizmov, vendar so ti procesi odvisni od okoljskih pogojev. Za določanje kvalitete zemlje se uporabljajo tradicionalne fiziološko/biokemične metode in novejša metode, s katerimi izvajamo monitoring najpomembnejših parametrov v tleh in ugotavljamo kvaliteto zemlje. Če pogledamo mikroskalo, je v tleh veliko število raznoraznih habitatov in posledično veliko število rastlin, živali in mikroorganizmov. Nezmotljiv princip narave, da se za vsako naravno organsko komponento najde tudi pot razgradnje, nam ne sme biti izgovor, da ne spremljamo organskih onesnaževalcev. Obstaja preveč negotovosti o njihovi usodi, zato jih moramo redno spremljati, ker se lahko pojavijo tudi kakšni škodljivi intermediati. Kvaliteta tal mora podpirati trenutne oblike življenja in evolucijo (Verstraete in Mertens, 2004).

## 2.2 TALNI MIKROORGANIZMI

V naravi lahko mikrobne celice zrastejo do stopnje, ki jim pravimo populacija. Metabolno sorodnim populacijam pravimo mikrobni cehi, več medsebojno povezanih cehov pa tvori mikrobno skupnost. Mikrobne skupnosti pa lahko v sodelovanju z skupnosti makroorganizmov tvorijo celoten ekosistem. Energija lahko vstopa v ekosistem v obliki sončne svetlobe, organskega ogljika in reduciranih anorganskih snovi. Svetlobo uporabljajo fototrofni organizmi, da lahko sintetizirajo novo organsko snov, ki ni sestavljena samo iz ogljika, ampak tudi dušik, žveplo, fosfor, železo in ostale elemente (Madigan in Martinko, 2006).

Eden izmed najpomembnejših faktorjev, ki vplivajo na mikrobno aktivnost v tleh, je dostopnost vode. Vsebnost vode je ena izmed najbolj variabilnih komponent v tleh, ki je odvisna od sestave tal, padavin, prepustnosti in rastlinja na površini. Poznamo vodo, ki pade na površino ali pa tako imenovano prosto vodo, ki se nahaja v porah med delci tal. Takšna voda ima v sebi raztopljene različne snovi in tej raztopini lahko pravimo talna raztopina. V zračnih tleh, kjer je koncentracija vode precej manjša, pride v te pore veliko zraka in posledično tudi kisika in je talna raztopina dobro nasičena s kisikom. V z vodo nasičenimi tlemi je edini prisoten in mikroorganizmom dostopen kisik tisti, ki je raztopljen v talni raztopini in ga le-ti hitro porabijo. Okolje v tem primeru postane anaerobno in spremeni se tudi populacija mikroorganizmov. Drugi pomemben faktor, ki vpliva na rast mikroorganizmov, je količina hranil. Največja mikrobna aktivnost je v plasteh, ki so bogata z organskimi snovmi, še posebej v rizosferi in okoli nje. Količina oziroma število mikroorganizmov in njihova aktivnost je odvisna od ravnotežja vseh hranil, ki so prisotni. V nekaterih okoljih je limitni faktor ogljik, nekje fosfor, spet v drugih pa dušik. (Madigan in Martinko, 2006).

Organizmi v nekem okolju so lahko indigeni oz. avtohotni ali vneseni oz. alohtoni. (Sylvia in sod., 1999). Najštevilčnejši organizmi v tleh so bakterije. Najdemo jih kar  $10^6$  do  $10^9$  na gram tal, sodelujejo pa pri kroženju in transformaciji ogljika, dušika, fosforja, žvepla, železa in drugih mineralov v tleh. Lahko so anaerobni, mikroaerofilni, fakultativno anaerobni ali aerobi. Najpomembnejši rodovi so: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*,

*Alcalignes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Xanthomonas* (Alexander, 1997). Aktinomicete predstavljajo 10-33 % delež bakterij v tleh in dajejo tlem tipičen vonj. Najpomembnejša rodova sta *Streptomyces* in *Nocardia* (Hattori in Hattori, 1973; Alexander, 1977). Pomembne so tudi fotoavtotrofne cianobakterije rodov *Anabaena*, *Calothrix*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* in *Plectonema*. Arheje so ena izmed najmanj raziskanih skupin organizmov v tleh. Njihova fiziološka karakterizacija in ekološki pomen v talnih mikrobnih združbah sta še neznan. Glive lahko predstavljajo večji delež biomase v tleh kot bakterije (Domsch in sod., 1980). Razgrajujejo poliharide v ostankih rastlin, s hifami povezujejo talne delce, zadržujejo vlago in pomembno prispevajo k aktivnosti v kisljih tleh. (Atlas in Bartha, 1993) najpogostejši so predstavniki rodov *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium* in *Trichoderma* in pa askomicete in bazidiomicete. Kvasovke razgrajujejo rastlinske ostanke in z ekstracelularnimi izločki povezujejo delce tal. Najpomembnejši rodovi so *Candida*, *Rhodotorula* in *Cryptococcus*. Pogoste so tudi alohtone kvasovke, ki v tla vstopijo z rastlinskim materialom (Atlas in Bartha, 1993). Alge naseljujejo tako zgornje kot spodnje sloje tal (Trainor, 1978). Najpomembnejši predstavniki so iz rodov *Chlorophycophyta*, *Rhodophycophyta* in *Euglenophyta*. Praživali so skupaj z nečlenarji pomembni plenilci bakterij, gliv, alg in drug drugega v tleh. Najdemo jih predvsem v zgornjih 15 cm, saj potrebujejo razmeroma visoke koncentracije kisika. Pomembni so za razgradnjo organskih materialov in polimerov, prezračevanja in homogenizacijo tal. Talne živali (žuželke, sesalci, deževniki ipd.) so pomembni za prezračevanje tal, kot plenilci in kot razgrajevalci organskih snovi (Atlas in Bartha, 1993).

### 2.3 VSTOP DNK V TLA

Zaradi uporabe gensko spremenjenih organizmov (Snow in sod., 2005), unikatnih nukleotidnih sekvenc rekombinantne DNK in sposobnosti, da lahko sledimo rekombinantni DNK v tleh (Lerat in sod., 2005), lahko rastlinsko rekombinantno DNK uporabimo kot okvir za razlago kroženja DNK v tleh. Rastlinska DNK vstopa v tla neprekinjeno in pretežno iz celic koreninskih vršičkov (Hawes, 1990; de Vries in sod., 2003), kot posledica

kolonizacije patogenov podzemne biomase (Polverari in sod., 2000; Kay in sod., 2002), preko peloda (Uribelarrea in sod., 2002; de Vries in sod., 2003) in med razgradnjo rastlinskih ostankov (Widmer in sod., 1997; Ceccherini in sod., 2003).

Tudi mikroorganizmi prispevajo k prosti talni DNK. Talne bakterije kot so npr. *Acinetobacter spp.* in *Bacillus subtilis* izločijo prosto DNK v okolje preko plazmidne in kromosomalne DNK (Lorenz in sod., 1991; Hamilton in sod., 2005; Backert in Meyer, 2006), infekcije z bakteriofagi (Redfield, 1988) in celične lize (Lorenz in sod., 1991; Steinmoen in sod., 2002). DNK se lahko sprosti v okolje tudi iz živih bakterijskih celic, če so izpostavljene prehranskemu stresu v čistih kulturah (Lorenz in sod., 1991). Na primer, *Bacillus subtilis*, ki raste na minimalnem gojišču, izloči DNK med lag fazo rasti čiste kulture (Lorenz in sod., 1991). Aktivno izločanje bakterijske DNK v tleh še ni bilo dokazano, vendar lahko do nje pride zaradi pomanjkanja hranil. Za obstoj proste bakterijske DNK v tleh je seveda v največji meri odgovorna celična liza, ki je poskrbi za preživetje tesno povezanih sevov v času stradanja (Recorbet in sod., 1993; England in sod., 1995, England in sod., 1997). Končni rezultat vstopa DNK v tla je bazen zunajcelične DNK v medporni talni raztopini. Ne glede na vir zunajcelične DNK v tleh, se lahko ohrani, razgradi za potrebe v DNK krogu ali pa se preko naravne transformacije vključi v mrežo prenosov lateralnih genov (Levy-Booth in sod., 2007).

Ko DNA vstopi v okolje, na njeno usodo vplivajo biološki, kemijski in fizikalni faktorji. Zunajcelična DNK se lahko v tleh veže preko kationskih vezi na talne minerale (Greaves in Wilson, 1969; Lorenz in Wackernagel, 1987; Crecchio in Stotzky, 1998), lahko se encimsko razgradi z zunajceličnimi DNazami mikrobnega izvora in služi kot hrana za rastline in mikrobno rast (Bowman in Cole, 1978; Romanowski in sod., 1991; Paget in sod., 1992; Redfield, 1993; Finkel in Kolter, 2001; Macfadyen in sod., 2001; Ceccherini in sod., 2003) ali pa vstopi v mikrobno DNK kroženje preko naravne bakterijske transformacije kompetentnih bakterij (Khanna in Stotzky, 1992; Lorenz in Wackernagel, 1994; Gebhard in Smalla, 1998, Gebhard in Smalla, 1999; Dubnau, 1999; de Vries in sod., 2001; de Vries in Wackernagel, 2004). Prosta DNK v okolju predstavlja veliko zalogo prostega P, hkrati pa s svojo razgradnjo izgube informacije, ki jih je včasih zapisovala. Po popolni razgradnji DNK v okolju ostanejo elementi C, O, N in P, ki pa se lahko uporabijo

pri sintezi novih nukleotidov ali pa vstopijo v ustrezne prehranjevalne verige. Nukleinske kisline (DNK in RNK) predstavljajo 10 % huminsko vezanih organskih fosfatov v mineralnih tleh (Baker, 1977), ekstracelularna in celično vezana DNK lahko predstavlja 9–13 % in 53 % izločenega P v tundri (Turner in sod., 2004) in naravni močvirski prsti (Turner in Newman, 2005).

Zunajcelično DNK kroženje v prsti vsekakor ni zaprt sistem. Znova in znova se dopolnjuje z novimi DNK iz živečih in razkrajajočih se organizmov, hkrati pa DNK zapušča krog z zunajcelično degradacijo ali pa jo uporabijo organizmi za izgradnjo novih nukleinskih kislin ali za razgradnjo v druge molekule (Levy-Booth in sod., 2007).

#### 2.4 OBSTOJNOST NUKLEINSKIH KISLIN V TLEH

DNK se ohranja v tleh, če se veže na talne minerale (pesek, glina), huminske substance in organomineralne komplekse. Adsorpcija na mineralne in huminske snovi DNK zaščiti pred zunajceličnimi mikrobnimi DNazami, ki drugače nevezano DNK v talni raztopini razgradijo. Od števila možnih vezav in mehanizma le teh igra glavno vlogo pri določanju količine DNK, ki se bo vezala na delce. Na primer, pesek veže DNK v manjših količinah kot glineni minerali zaradi razlik v površini delcev in njihovem naboju (Levy-Booth in sod., 2007). Adsorpcija DNK na delce je hitra in odvisna od ionskih razmer (Lorenz in Wackernagel, 1987).

Več DNK se veže na talne delce, če je koncentracija soli višja ali pa je nižji pH (Aardema in sod., 1983). To dejstvo potrjuje tudi teorija, da je adsorpcija polimerov višja, ko je elektrostatska vez med pozitivno nabitim polimerom in negativno nabito površino zmanjšana z višanjem ionske moči ali zmanjševanjem vrednosti pH (Hesselink, 1983).

## 2.5 KROŽENJE DNK V TLEH

Obstojnost in razgradnja DNK sta pomembna procesa, ki dopolnjujeta kroženje DNK v tleh. Razgradnja je lahko tako zunaj kot znotrajcelična. Žive celice lahko sintetizirajo DNK po dveh poteh: reševanja DNK in sinteze »de novo«. Zaradi energijskih potreb sinteze DNK po principu »de novo« (Henderson in Paterson, 1973), so predlagali, da pot reševanja DNK oz. sinteza DNK iz delnih razgradnih produktov DNK, igrajo temeljno vlogo v tleh (Kornberg, 1974; Redfield, 1993). Pot reševanja delno razgrajene DNK, kot so nukleotidi, nukleozidi, riboze in baze, omogoča, da se znova povežejo v nukleinske kislin brez nadaljnje razgradnje, po tem ko le-ta vstopi v celico (Levy-Booth in sod., 2007).

## 2.6 GENSKA TRANSFORMACIJA DNK V BAKTERIJSKI MIKROBNI ZDRUŽBI

Naravna transformacija predstavlja drugi del za zaključek kroženja zunajcelične DNK v tleh. Je edini znani proces, s katerim lahko prokarioti sprejemajo, vključujejo in izražajo zunajcelično DNK. Do sedaj so naravno transformacijo odkrili v približno 90 različnih vrstah, vključno s talnimi bakterijami *Bacillus subtilis* in *Acinetobacter spp.* (de Vries in Wackernagel, 2004). Naravno transformacijo lahko delimo na 4 korake: vezava zunajcelične DNK na celično površino kompetitivne celice, sprejem proste DNK skozi celično steno in/ali membrano, vezava v bakterijski genom in izražanje tuje DNK v celici (Levy-Booth in sod., 2007). Dejstvo, da je kroženje medsebojno povezan in odprt, leži v dveh vzrokih. Prvi je ta, da njegove komponente vsebujejo veliko energije in hranilnih snovi, drugi pa se skriva v dejstvu, da nepoškodovane sekvence nosijo genske zapise, ki jih lahko preko naravne transformacije sprejmejo mikroorganizmi v bližini. Pod posebnimi pogoji lahko mikroorganizmi tuje sekvence vključijo v svoj genom, kar lahko privede do nepredvidenih okoljskih vplivov (Levy-Booth in sod., 2007). V tleh najdemo številne okoljske in fizikalne pregrade, ki preprečujejo prenos genov v talne mikroorganizme, kot so razgradnja DNK v prsti, omejen sprejem DNK ter pomanjkanje vključevanja in obstojnosti v genomu prejemnika. Nenazadnje je naravna transformacija tuje DNK v native talne mikrobne populacije pomemben del prokariotske evolucije (Levy-Booth in sod., 2007).

## 2.7 RAZGRADNJA DNK V TLEH

Proces razgradnje DNK se prične z encimsko cepljenjem visokomolekularne, dvojno zavite DNK. (Greaves in Wilson, 1970; Blum in sod., 1997). Na kratko, nespecifične zunajcelične endonukleaze v tleh razcepijo DNK na manjše oligonukleotide, velike približno 400 bp (Blum in sod., 1997; Demaneche in sod., 2001). Pomemben rezultat cepitve je izguba genskih informacij (Levy-Booth in sod., 2007). Primarni mehanizem razgradnje zunajcelične DNK v tleh naj bi bile bakterijske DNaze (Blum in sod., 1997). Talne bakterije aktivno sproščajo nukleaze v tla, da povišajo dostopnost hranil, med njimi tudi zunajcelično DNK dostopnejšo encimom. Mikrobnost rasti in izločanje nukleaz se precej poviša, ko pride v tla DNK. Blum in sod. (1997) so odkrili, da se je število mikroorganizmov povečalo za en velikostni razred v 12 urah po dodatku DNK v ilovnata tla in med tem časom se je razgradilo približno 68 % od dodanih 50 mg DNK.

Na kinetiko razgradnje DNK močno vpliva temperatura. Gulden in sod. (2005) so določili, da se razpolovna doba tarčnih sekvenc ekstracelularne DNK v izcednih vodah zniža s povišanjem temperature in predlagal, da je razgradnja sekvenc encimski proces, ki temelji na reakcijskih stopnjah. Poleg tega pa se razgradnja DNK precej upočasni v zamrznjenih tleh. Kljub temu nekaj raziskovalcev domneva, da se proces razgradnje neha pri 0 °C, Henriksen in Breland (1999) pa sta našla znatno mikrobnost aktivnost pri 0 °C in manj, Diaz-Ravina in sod. (1994) pa so ugotovili, da je minimalna temperatura mikrobne razgradnje DNK povezana z najnižjo temperaturo, pri kateri lahko bakterije ekstrahirajo timidin iz zamrznjenih tal (-8,4 °C). Čeprav za encimsko razgradnjo DNK velja da upade ali preneha v zamrznjenih ali izsušenih tleh, pa procesi kot so kemijska hidroliza, kemijska oksidacija in cross-linking DNK vseeno razgradijo DNK (Hofreiter in sod., 2001). Willerslev in sod. (2004) so poročali, da bi lahko medveržno povezovanje preprečili pomnoževanje DNK po 400,000 letih. Teoretično obstojnost DNK v tleh, lahko potrdimo z dejstvom, da so našli nepoškodovano DNK mamuta v permafrostu, staro 13,775 let (Greenwood in sod., 1999). Razmerje G+C lahko prav tako vpliva na kinetiko razgradnje DNK v zamrznjenih tleh. Citozin je prav posebej občutljiv na hidrolitično deaminacijo in DNK iz gram pozitivnih aktinobakterij, ki imajo visoko vsebnost G+C baznih parov se je



izkazala za bolj obstojno v zamrznjenih tleh kot pa DNK iz gram pozitivnih *Clostridiaceae*, ki imajo nizko vsebnost G+C baznih parov (Hofreiter in sod., 2001). To lahko ima posledice za genetske študije mikrobne raznovrstnosti v zamrznjenih tleh in tundri (Levy-Booth in sod., 2007).

## 2.8 RAZTOPLJEN ORGANSKI OGLJIK

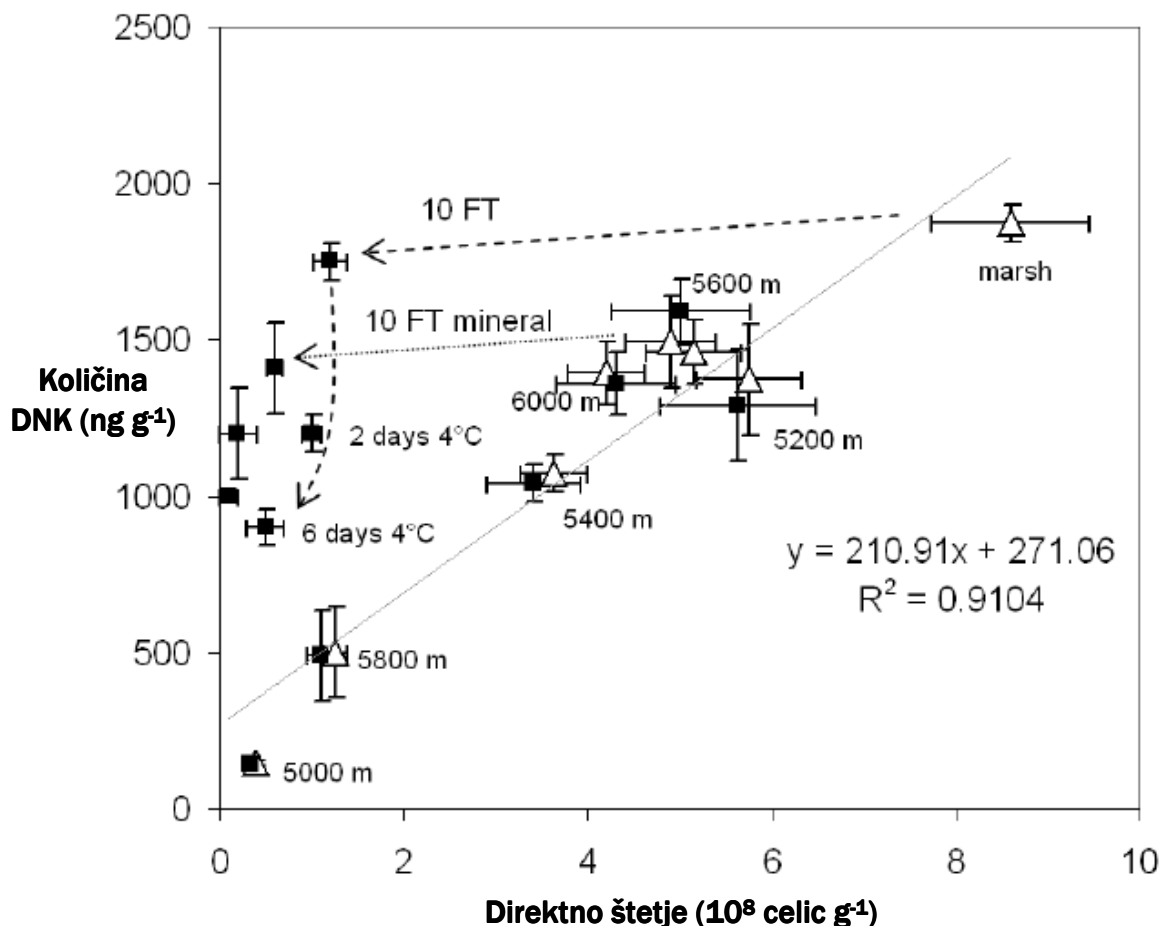
Celotni ogljik (TC) delimo na celotni anorganski ogljik (TIC) in celotni organski ogljik (TOC). TOC pa delimo še naprej na raztopljen (DOC), neraztopljen (POC) in hlapljiv organski ogljik (VOC) (Lobnik, 2009).

Raziskovalci so odkrili tudi potencialno izgubo ogljika zaradi povišanega sproščanja DOC iz šotnih tal. Predlagali so, da je povišana koncentracija DOC posledica povišane encimatske aktivnosti, še posebej  $\beta$ -glukozidaze, zunajceličnega encima, ki je vpleten v sproščanje ogljika iz organske snovi. Ta biološki mehanizem povzroča na koncu inkubacije višjo koncentracijo DOC kot na začetku, kar se tudi ujema s višanjem aktivnosti  $\beta$ -glukozidaze. Poleg tega med koncentracijo DOC in nalaganjem dušika na začetku inkubacije ni nobene povezave, po desetih dneh pa lahko opazimo pozitivno korelacijo. To dejstvo podpira izjavo, da povišana mikrobna aktivnost vpliva na sproščanje in posledično povišanje koncentracije DOC (Bragazza in sod., 2006). Tudi Schmitt in sod. (2008) so pokazali, da lahko CO<sub>2</sub> precej spremeni vsebnost in količino organskih snovi v tleh.

## 2.9 MIKROBNA AKTIVNOST PRI NIZKIH TEMPERATURAH

Nizke temperature, ciklanje (prehajanje preko zmrzišča) ter hitre temperaturne spremembe, so uničujoče za mikroorganizme (Walker in sod., 2006) zaradi vodnih kristalov, ki vodijo do denaturacije proteinov, poškodb membrane, celične dehidracije in nizke metabolne aktivnosti (Nedwell, 1999; Rodrigues in Tiedje, 2008). Kljub temu se število bakterij v himalajskih tleh ne spreminja preveč niti po 50 ponovitvah CO<sub>2</sub>, ki ustrezajo okoljskim spremembam. Opaziti pa je vsaj 45- 48 % upad bakterijskih celic pri direktnem štetju v tleh zmernega pasu izpostavljenih himalajskemu nihanju temperatur (Stres in sod., 2010). Eksperiment je pokazal za 15 % znižanje osnovne respiracije pri vzorcu iz Himalaje, ter

kar za 90 % upad pri dveh vzorcih zmernega pasu, pri čemer se koncentracija prisotne DNK ni zmanjšala. Šele po inkubaciji pri 4 °C se je koncentracija DNK signifikantno zmanjšala, število celic pa ostalo nespremenjeno (Slika 2) (Stres in sod., 2010).



Slika 2: Odnos med številom bakterijskih celic v himalajskem sedimentu (direktnim štetjem pod mikroskopom) ter koncentracijo DNK ekstrahirano iz okolja (Stres in sod., 2010).

Zadnje študije so tudi pokazale, da se talna mikrobna respiracija v večini tal ne prilagodi na nizke temperature (Hartley in sod., 2008; Barcenás-Moreno in sod., 2009), tudi če jo spremljamo več mesecev. Eksperiment COZ je pokazal, da se metabolno vzorca mineralnih tal in barja v prvih 40 COZ močno spreminjata, na drugi strani pa so se himalajska tla le malo metabolno spremenila. Po 40 COZ so se močvirska in mineralna tla metabolno stabilizirala, vendar so ostala različna in se po metabolnih lastnostih niso približala himalajskim tlem. Mineralna in barjanska tla so imela veliko večji odziv na

organske kisline in ogljikove hidrate kot himalajska tla, bila pa so usmerjena k uporabi aminokislin. Mikrobna populacija iz Himalaje je bila veliko bolj odporna pri CO<sub>2</sub> v primerjavi z mikrobnimi populacijami iz barja in mineralnih tal, ki so bile prav tako izpostavljene CO<sub>2</sub>. Tukaj je opaziti velik upad celic in aktivnosti, vendar pa so preživele celice bile sposobne funkcionalne reorganizacije pri nizkih temperaturah. Posledica je bila toleranca na dodatne CO<sub>2</sub>, stalna aktivnost pri nizkih temperaturah in spremenjene, ampak stabilne fiziološke značilnosti na ravni skupnosti (Stres in sod., 2010). Še vedno pa ostaja odprto vprašanje, kaj se zgodi z DNK poškodovanih in odmrlih celic po CO<sub>2</sub> ter kako to vpliva na signal strukture mikrobnih združb, ki jih opazujemo.

## 2.10 UČINKI CIKLOV ODTALJEVANJA IN ZAMRZOVANJA (CO<sub>2</sub>)

Pri eksperimentu, kjer so iskali korelacijo mikrobnega dihanja in CO<sub>2</sub>, se je mikrobno dihanje strmo zniževalo s časom v vseh talnih vzorcih, tako da je bil CO<sub>2</sub> še komaj zaznaven s titracijsko metode po sedmem CO<sub>2</sub>. Na začetku poskusa se je mikrobno dihanje po dodatku lignina podvojilo, po dodatku trave pa kar potrojilo. Medtem ko je mikrobno dihanje konstantno upadalo v kontrolnih vzorcih, je bila količina sproščenega CO<sub>2</sub> povišana tik za ciklom odtaljevanja v CO<sub>2</sub> vzorcih. Posledično je bilo mikrobno dihanje CO<sub>2</sub> vzorcev višje v sredini cikla, vendar nižje ali podobno kontrolnim vzorcem, ki niso bili izpostavljeni CO<sub>2</sub>, na začetku in na koncu CO<sub>2</sub> (Feng, 2007).

Ker v izbranih tleh niso zaznali anorganskega ogljika, so predvideli, da je količina organskega ogljika enaka izmerjenemu skupnemu ogljiku. Tako organski ogljik kot skupni dušik v talnih vzorcih se tekom poskusa nista spreminjala (Feng, 2007).

Fosfolipidne maščobne kisline (PLFA) so bile izmerjene v vseh vzorcih, vendar v različnih koncentracijah. Bakterijski markerji za PLFA niso pokazali sprememb med vzorci v CO<sub>2</sub> in kontrolnimi vzorci. Med prostimi lipidi so indentificirali sterole, terpenoide, ogljikove hidrate, n-alkanojske kisline, n-alkanole in n-alkane. Koncentracija prostih lipidov se je povišala v vseh vzorcih na začetku, tekom poskusa pa upadala. Prav tako je dodatek trave

močno povišal koncentracijo prostih lipidov, čeprav je tudi dodatek lignina povzročil povišanje koncentracije. Spremljali pa so tudi obnavljanje mikrobne biomase po osmem CO<sub>2</sub> in ugotovili, da se tako bakterije kot glive skoraj popolnoma obnovijo pa 24 urah na 17°C. Mineralizacija ogljika je bila prvi dan po odtalitvi še vedno nizka in konstantna vrednost PLFA ni imela povezave z mikrobnim dihanjem, ki je padalo tekom poskusa. Ti podatki kažejo na to, da mikrobno dihanje ni tesno povezano z mikrobno biomaso, ampak da ostali faktorji kot so dostopnost in kvaliteta substrata, bolj kontrolirajo to dihanje. Npr. na začetku poskusa je bila velikost mikrobne respiracije povezana s količino lahko razgradljivega substrata (prostih lipidov) v tleh (Feng, 2007).

PLFA so biomarkerji za aktivne mikrobne celice, mikrobno dihanje pa označuje mineralizacijo ogljika s talnimi mikroorganizmi ali dejansko aktivnost živečih mikrobov. Mikrobno dihanje ni odvisno samo od števila aktivnih mikroorganizmov, odvisno je tudi od drugih okoljskih faktorjev kot so vlažnost tal, temperatura, dostopnost substrata in hitrost raztapljanja (Feng, 2007).

Številne študije so pokazale, da CO<sub>2</sub> povzroča motnje mikrobne aktivnosti, kot so mineralizacija ogljika in dušika. Te motnje so ponavadi posledica povišane ravni nestabilnih substratov v tleh kot posledica poškodb mikroorganizmov pri zamrzovanju in odtaljevanju. Za proste lipide (veljajo kot lahko razgradljivi) ne moremo trditi, da imajo direktno vlogo pri izpustu CO<sub>2</sub>, ker velikost izpusta CO<sub>2</sub> v poskusu Fenga in sod. (2007) ni sorazmerna s količino prostih lipidov v tleh. En vzorec je odstopal po količini prostih lipidov, vendar je imel enak izpust CO<sub>2</sub>. Kakorkoli, koncentracija prostih lipidov se je po nekaj CO<sub>2</sub> stopnjah močno zmanjšala v vseh vzorcih, kar nam pove, da je mikrobna aktivnost inducirana s CO<sub>2</sub>, uporabljala lahko razgradljive substrate v tleh, najverjetneje proste lipide, ki jih je pretvarjala v bakterijski ogljik. Prosti lipidi lahko torej posredno prispevajo k neznanemu viru izpusta CO<sub>2</sub>. Podobno ugotovitvam sorodnih študij, je bil izpust CO<sub>2</sub>, induciran s CO<sub>2</sub>, kratkotrajen in hitro zmanjšan še pred upadom prostih lipidov. SOM frakcije (prosti lipidi, vezani lipidi in fenoli pridobljeni iz lignina) so se vse rahlo povečale na začetku poskusa, še najbolj pa so se povečali prosti lipidi. To povečanje je najverjetneje posledica poškodb talnih agregatov s CO<sub>2</sub>, kar je izpostavilo fizično varovane SOM bakterijam in kemijskimi reakcijami. Med tremi opazovanimi SOM

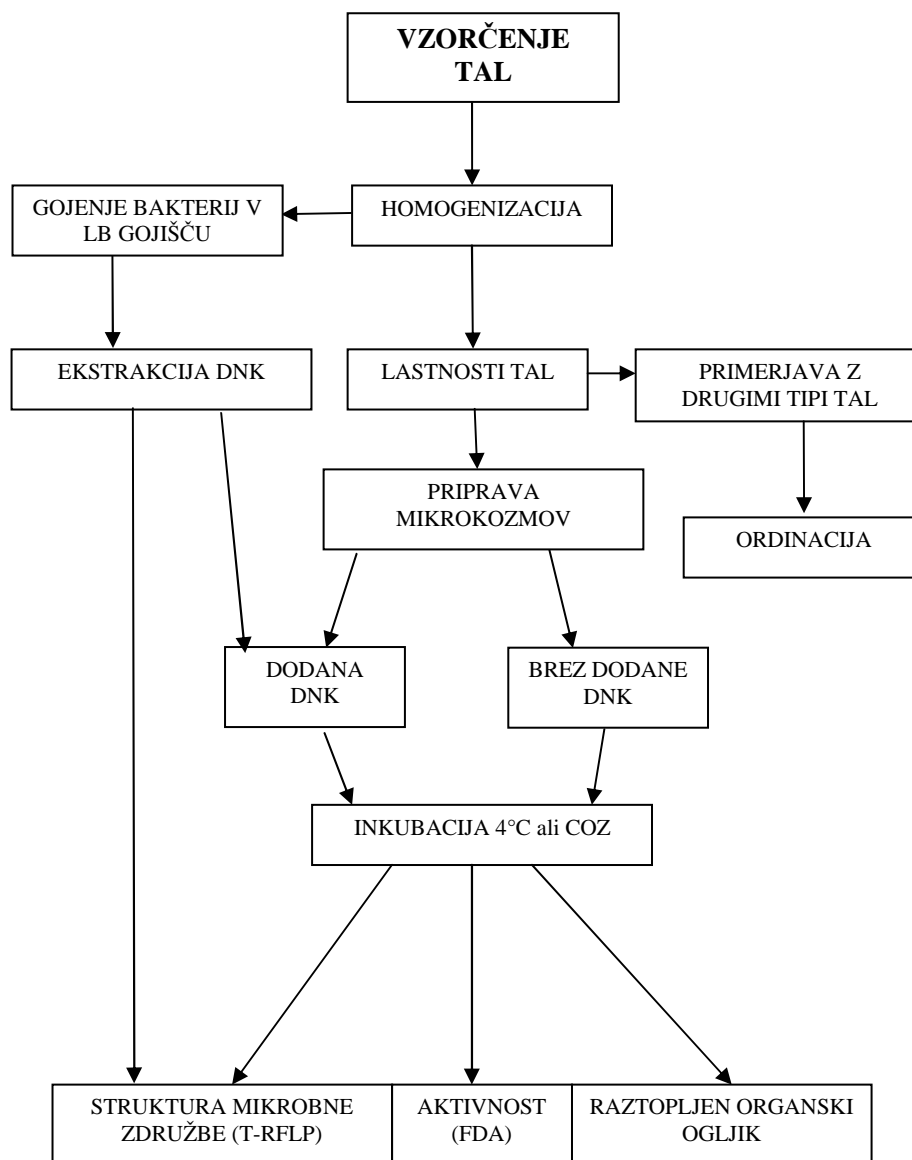
frakcijami so se edino prosti lipidi zmanjševali s ponavljajočimi COZ, medtem ko so vezani lipidi in ligninske komponente ostale nespremenjene (Feng, 2007).

## 2.11 ODPRTA VPRAŠANJA, IZZIVI

Zunajcelično DNK kroženje v tleh ni zaprt sistem. Venomer se dopolnjuje z DNK, ki jo oddajo v okolje živi in razkrajajoči se organizmi. DNK se lahko iz svojega kroženja odstrani z zunajcelično razgradnjo ali pa jo sprejmejo organizmi, ki jo reintegrirajo v DNK (reševanje in preoblikovanje) ali ostale molekule (razgradnja). Dejstvo, da je krog odprt in medsebojno povezan, je ključnega pomena iz dveh razlogov. Prvi je ta, da so njegove komponente hranilne in energijsko bogate. Razgrajena DNK ali ohranjeni stranski produkti igrajo pomembno vlogo v rasti mikroorganizmov in rastlin v nerodovitnih tleh. Drugi razlog pa je ta, da lahko nerazgrajen odsek DNK še vedno nosi zapis, ki ga lahko poberejo sosednji mikroorganizmi preko naravne transformacije. Pod posebnimi pogoji se lahko ta odsek vključi v DNK gostujoče celice. V tleh najdemo številne okoljske in fiziološke ovire, ki preprečujejo prenos genov v talne mikroorganizme, kot so degradacija zunajcelične DNK, omejen sprejem DNK in slabo povezovanje in obstojnost v genomu prejemnika. Nenazadnje, naravna transformacija tuje DNK v naravno mikrobo populacijo v tleh je pomembna komponenta prokariotske evolucije. Homologija rekombinantne DNK mikrobnih genov in selektivni pritisk na transgenih sistemih poljedelstva sta privedla do zaskrbljenosti glede uporabe transgenih rastlin v poljedelstvu. Kakorkoli, ko je genski zapis enkrat razgrajen, lahko rekombinantno DNK smatramo kot ostalo zunajcelično DNK in je ne smemo opredeliti kot problem v okolju. Raziskave izločanja rekombinantne DNK v tla so pogosto osredotočene na specifične elemente obnašanja DNK. Zaradi boljšega razumevanja usode DNK v tleh moramo vse te elemente združiti, da bomo lahko natančneje predvideli tveganje izločanja rekombinatne DNK v okolje (Levy-Booth in sod., 2007).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SHEMA EKSPERIMENTA



Slika 3: Shema poteka poskusa

### 3.2 VZORČENJE

Vzorčili smo meseca aprila 2009 na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete, Oddelek za agronomijo (Slika 4). Z naključnim dvodimenzionalnim vzorčenjem zgornjih 10 cm tal na površini 10 m x 10 m smo pridobili 25 kg vzorca tal.



**Slika 4: Satelitski posnetek mesta vzorčenja na eksperimentalnem polju Biotehniške fakultete (Google maps, 2010)**

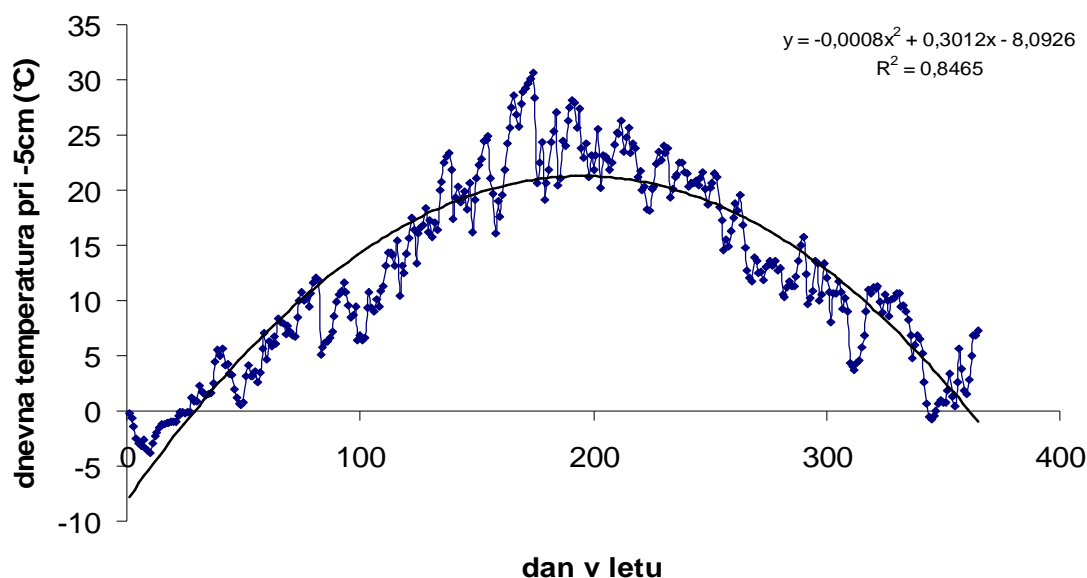
Iz tal smo odstranili večje kamenje in ostanke rastlinja ter korenin, nato pa smo tla homogenizirali skozi sito s premerom por 4 mm in jih shranili v plastičnih vrečkah pri temperaturi 4 °C do uporabe v eksperimentih (manj kot 10 dni).

### 3.3 PRIPRAVA MIKROKOZMOV

Pripravili smo 230 mikrocentrifugirk, v katerih je bilo 0,9 g svežih tal. Za tako majhno količino tal smo se odločili, ker bi bila količina dodane DNK v nasprotnem primeru prevelike za samo izvedbo eksperimentov. Mikrocentrifugirke z vzorci smo primerno označili v dve seriji, in sicer COZ (-4 °C in 4 °C) in 4 °C. Mikrocentrifugirke smo znotraj

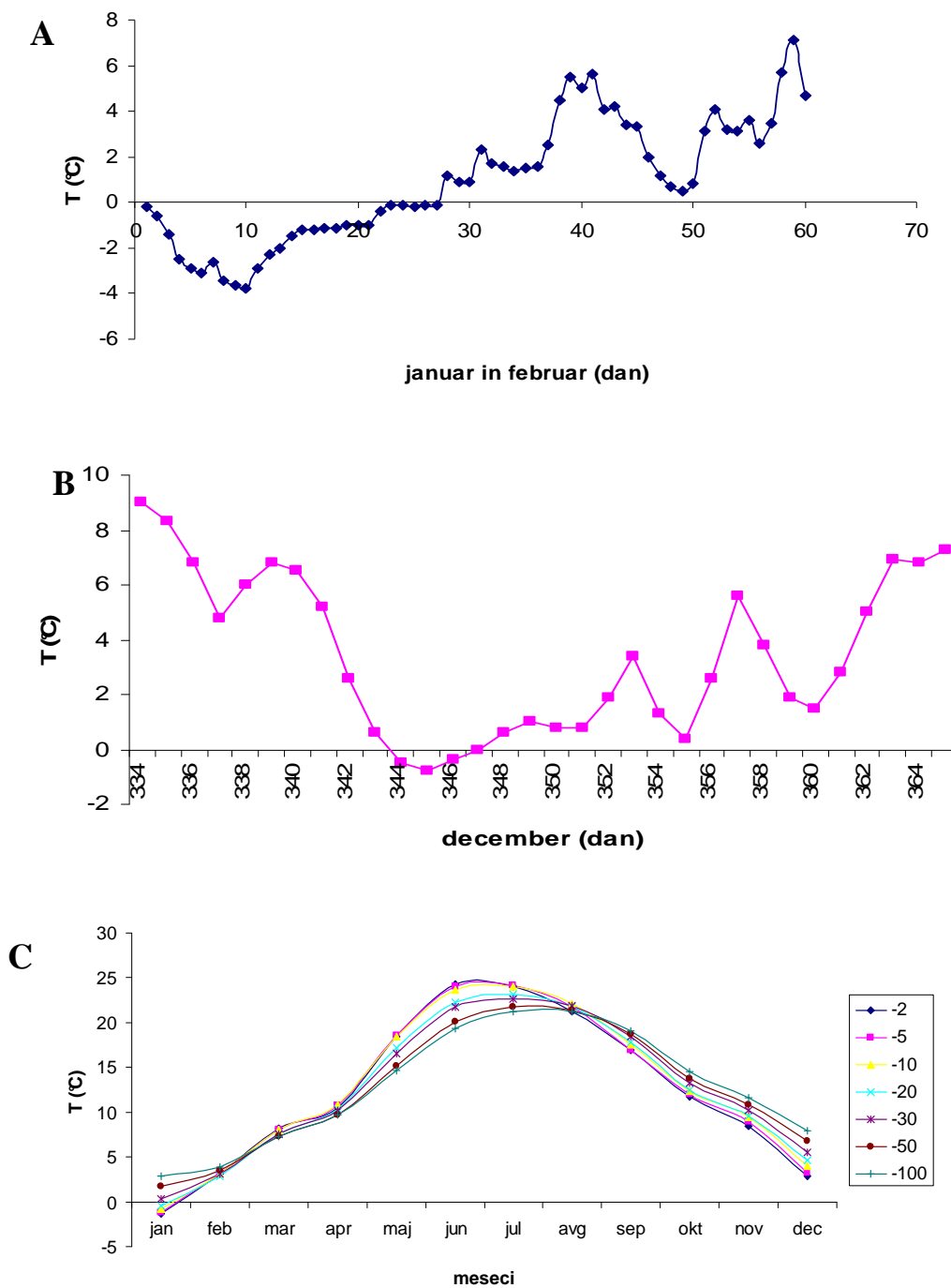
obeh serij znova razdelili v dve novi seriji (brez dodatka DNK, z dodatkom DNK) ter jim dodali 100 µl raztopine vode, v kateri je bilo 7,125 µg DNK iz gojene frakcije mikrobnih združb. Gojeno frakcijo mikrobnih združb smo nagojili v gojišču LB pri 37 °C. Celice smo nato skoncentrirali na centrifugi (Beckman coulter, Allegra X- 12R) pri 3000 obratih na minuto in po klasični poti izolirali njihovo DNK. Po izolaciji DNK iz gojene frakcije mikrobnih združb je bila koncentracija raztopljene DNK  $2,85 \pm 0,12$  µg/ ml. DNK smo razredčili in jo v alikvotih dodali v vzorce tal označene 4 °C z DNK in COZ z DNK. Končna koncentracija DNK v alikvotih je bila 7,125 µg/ 100 µl vode. Ta koncentracija je predstavljala količino DNK, ki ustreza lizi 64 % prisotne bakterijske biomase. Pri tem smo upoštevali, da je koncentracija DNK na celico v tleh  $2,4 \times 10^{-15}$  g (Christensen in sod., 1995, Christensen in sod., 1993; Bakken in Olsen, 1989). Eksperimentalna tla z in brez dodane DNK smo potem izpostavili konstantni inkubaciji pri 4 °C ali COZ.

Mikrocentrifugirke iz serije 4 °C smo inkubirali v peščeni kopeli v hladilniku pri 4 °C, mikrocentrifugirke z oznako COZ pa smo predstavljali iz -4 °C na 4 °C. Po prenosu iz -4 °C smo vzorce inkubirali 7-8h na 4 °C, nato pa smo jih znova prestavili na -4 °C. Serija COZ predstavlja primer vsakoletnega nihanja temperature preko zmrzišča (Slika 5; Slika 6), kjer prihaja v eksperimentalnih razmerah do propada dela mikrobne biomase (Stres in sod., 2010).



Slika 5: Povprečne dnevne temperature tal (°C) v globini -5 cm skozi leto na merilni postaji Ljubljana (ARSO, 2002: 4)





Slika 6: Nihanje temperatur tal na globini -5 cm v mesecih januar in februar (A), december (B) in povprečne mesečne temperature tal (°C) po različnih globinah v cm merilne postaje LJ- Bežigrad (C) (ARSO, 2002: 11).

### 3.4 OSNOVNE ZNAČILNOSTI TAL

#### 3.4.1 pH tal

Talni pH ima velik vpliv na biokemijske značilnosti znotraj in zunajceličnih encimov, na sam pH gradient med zunanostjo in notranostjo celic, topnost mineralov v tleh, obliko amonijskega dušika in topnost CO<sub>2</sub>. Ločimo aktivno in potencialno kislost. Aktivna kislost je dejanska kislost talne suspenzije, potencialna kislost pa je ponavadi nižja, saj vsebuje še vse H<sup>+</sup> ione, ki so vezani na talne koloide, in Al<sup>3+</sup> ione. Za določanje aktivne kislosti smo v stekleno čašo odtehtali 10 g vzorca in dodali 20 ml dH<sub>2</sub>O. S stekleno palčko smo dobro premešali suspenzijo in po 1 uri izmerili pH vrednost s pH-metrom (Orion 520A). Za merjenje potencialne kislosti je postopek enak, le da smo vzorec namesto z vodo suspenzirali z 1 M KCl.

#### 3.4.2 Vlažnost tal

Vlažnost tal opisuje trenutno vodno stanje tal, saj se vlažnost spreminja v odvisnosti od vremenskih pojavov in letnih časov (padavine, sušna obdobja, temperature). Do konstantne teže posušene lončke smo zatehtali, dodali vzorec tal in znova zatehtali. Lončke z vzorcem smo sušili preko noči v pečici pri 105 °C. Lončke smo znova stehtali in iz razlike določili maso odsušene vode. Delali smo v treh ponovitvah in delež vlažnosti izračunali po formuli:

$$\% V = ((m_{\text{tal}} - m_{\text{suhih tal}}) / m_{\text{suhih tal}}) * 100$$

#### 3.4.3 Tekstura tal

Tekstura tal je fizikalni parameter, ki pove, iz katerih komponent so tla sestavljena. Struktura tal razlaga, na kakšen način oz. v kakšnem razmerju se posamezne komponente v tleh nahajajo in povezujejo. Sestava tal vpliva na fizikalno- kemijske lastnosti, le-te pa na

izmenjavo plinov, vode, s tem pa tudi hranilnih snovi: večja kot je površina delca v tleh v primerjavi z njegovim volumnom, večji je koeficient izmenjave snovi v tleh. V infuzijsko stekleničko smo zatehtali 20 g talnega vzorca (vlažnost je bila približno 50 %) in dodali 50 ml 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Infuzijsko stekleničko smo stresali 3 ure. Na lijak smo postavili sito in vse skupaj postavili na stekleni valj. Vsebino infuzijske stekleničke smo prelili skozi sito v lijak ter spirali z destilirano vodo, dokler niso na situ ostali le delci večji od 0.2 mm. Ostanek na situ smo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič, maso pa označili kot s črko a. Suspenziji v valju smo dolili destilirano vodo do 1000 ml. Valj smo zamašili in stresali 3 min. Nato smo valj položili na mizo in pustili, da delci sedimentirajo. Po 44 s smo iz globine 10 cm odpipetirali 10 ml suspenzije in jo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič- 1. frakcija, njeno maso pa označimo s črko b. Valj smo znova stresali 3 min, pustili da delci sedimentirajo in po 4 min 27 s vzeli iz globine 10 cm 10 ml suspenzije in jo prenesli v predhodno posušen in stehtan tehtič- masa 2. frakcije oz. jo zamenjamo s črko c. Znova smo valj stresali 3 min in po 7 h 35 min iz globine 10 cm odpipetirali 10 ml suspenzije, ki smo jo dali v tehtič in nam je služila kot 3. frakcija, njeno maso pa smo označilo s črko d. Vse štiri tehtiče smo dali sušiti v pečico preko noči na 105 °C. Po sušenju smo tehtiče znova stehtali in dobili maso posameznih frakcij v 10 ml vzorca. Material iz sita predstavlja delce, ki so večji od 0,2 mm- GP (grobi pesek). Prva frakcija predstavlja delce manjše od 0,05 mm- GM (grobi melj), FM (fini melj) in G (glina), druga frakcija delce manjše od 0,02 mm (fini melj in glina), tretja frakcija pa predstavlja delce manjše od 0,002 mm (glina). Delež posameznih frakcij izračunamo po naslednjih formulah (upoštevati moramo, da smo zatehtali 10 g vzorca, da imamo v 10 ml suspenzije 0,1 g vzorca tal in v 10 ml suspenzije približno 0,01 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ):

$$\% \text{ GP} = (a / 10) * 100$$

$$\% \text{ G} = ((d - 0,01) / 0,1) * 100$$

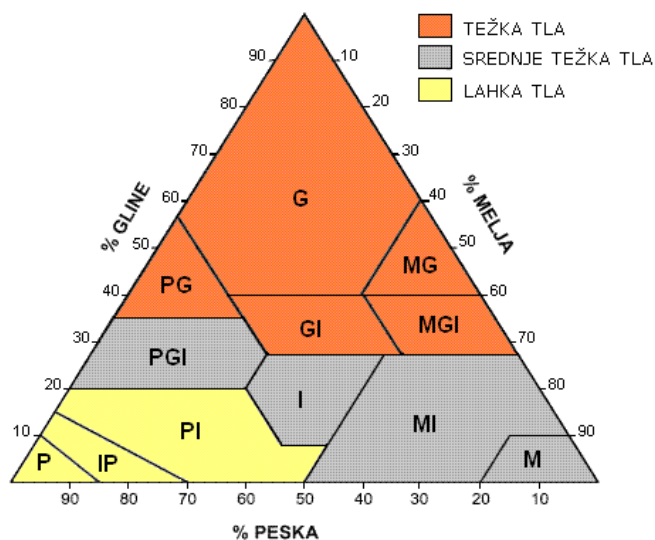
$$\% \text{ FM} = ((c - d) / 0,1) * 100$$

$$\% \text{ GM} = ((b - c) / 0,1) * 100$$

$$\% \text{ FP} = 100 - (\% \text{ GP}) - (\% \text{ GM}) - (\% \text{ FM}) - (\% \text{ G})$$

$$\% \text{ P} = \% \text{ GP} + \% \text{ FP}$$

$$\% \text{ M} = \% \text{ FM} + \% \text{ GM}$$



Slika 7: Teksturni trikotnik (Zupan in sod., 1998). P-pesek, IP-ilovnat pesek, PI-peščena ilovica, PGI-peščeno glinasta ilovica, PG-peščena glina, M-melj. MI-meljasta ilovica, MGI-meljasto glinasta ilovica, MG-meljasta glina, I-ilovica, GI-glinasta ilovica, G-glina

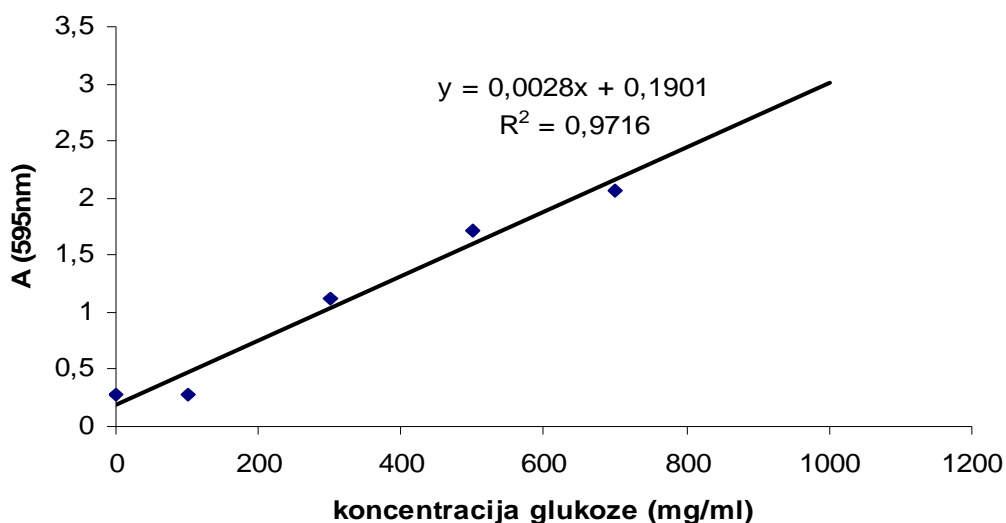
### 3.4.4 Ugotavljanje koncentracije raztopljenega organskega ogljika v tleh

Kemijska potreba po kisiku je parameter, ki poda količino kisika, potrebno za kemijsko oksidacijo raztopljenih organskih snovi. S KPK lahko določimo vse organske snovi – biološko razgradljive in nerazgradljive. Zato je KPK dopolnilo BPK (biološka potreba po kisiku). BPK je množina kisika, ki je potrebna za oksidacijo razgradljivih organskih snovi s pomočjo mikroorganizmov. Za ugotavljanje KPK se danes uporablja kalijev dikromat ( $K_2Cr_2O_7$ ), zaradi velike oksidacijske sposobnosti, uporabnosti za širok spekter vzorcev in enostavne določitve prebitka dikromata. V kisli žveplovni raztopini se s kalijevim dikromatom oksidira večina organskih snovi skoraj popolnoma v ogljikov dioksid in vodo, zato lahko istovetimo dobljene vrednosti KPK s popolno oksidacijo ogljikovih spojin. Organske snovi reducirajo kromove (VI) ione v kislem mediju v kromove (III) ione, kar se kaže kot sprememba barve v zeleno:



Motnje lahko povzročajo kloridni ioni, ki pa jih lahko odstranimo z dodatkom srebrovega sulfata, pri čemer nastane slabo topen kompleks. K popolnejši oksidaciji organskih snovi pripomorejo še koncentrirana  $H_2SO_4$ , visoka temperatura in katalizator reakcije  $Ag_2SO_4$ .

330  $\mu$ l vzorca (10 g tal in 20 ml destilirane vode) smo zmešali v mikrocentrifugirkah s 670  $\mu$ l prejšnji dan pripravljenega reagenta KPK (R1+ R2; 1,5: 3,5) in jih inkubirali 2h na 150 °C. Vzorce smo ohladili, centrifugirali 10 min pri 3000 obratih na minuto, da smo odstranili nastalo oborino, odpipetirali 300  $\mu$ l v mikrotitrsko ploščico in s čitalcem ploščic (BIOTEK ELx808) spektrofotometrično izmerili absorbanco nastale zelene barve pri 595 nm. Intenziteta zelene barve je v sorazmerju s kisikom, ki se je porabil za oksidacijo organske snovi v vzorcu. Poskus smo ponovili v treh ponovitvah. Iz znanih koncentracij referenčne organske snovi (glukoza; 0, 100, 300, 500, 700 in 1000  $\mu$ g/ml), smo po enakem postopku pripravili umeritveno krivuljo (Slika 8).



**Slika 8:** Umeritvena krivulja standardnih koncentracij glukoze za določanje koncentracije raztopljene organske snovi v hladnih ekstraktih tal s tehniko KPK. Pri končnem izračunu moramo upoštevati velikost zatehtanega vzorca tal, volumen vode, molsko maso glukoze (180 g/mol) in ogljika (12 g/mol) ter število ogljikovih atomov v molekuli glukoze.



### 3.4.6 Ugotavljanje velikosti molekul v vodi topnih organskih snovi

Ogljik v tleh je lahko anorganskega izvora (karbonatni) in organskega izvora (živa biomasa, neživa biomasa-razkrojeni in slabo razkrojeni ostanki). Vsebnost organske snovi v tleh je pomembna kot vir hranil za mikroorganizme. Količina organske snovi je odvisna od sestave tal: majhni delci z velikim površinskim nabojem zadržijo več organske snovi kot veliki nenabiti delci. Pomemben je tudi naboj organske snovi: pozitivno nabita snov se močneje veže na negativno nabite minerale glin in je tako mikrobom manj dostopna.

V vsakih tleh lahko najdemo DOM (raztopljen organska snov). V nekaterih ekosistemih, kot je npr. močvirje ali barje, ga je veliko, spet v drugih nekoliko manj. Prav sposobnost asimilacije DOC (raztopljen organski ogljik) je ključen prispevek bakterij v prehranjevalni verigi oz. natančneje v mikrobni zanki. Tako postane ogljik dostopen višjim trofičnim nivojem.

V poskusu smo ugotavljali razmerje absorbanc raztopljenega organskega ogljika v vzorcih, ki smo jih inkubirali vzporedno z ostalimi vzorci. Vzorce smo pripravili popolnoma enako kot vzorce za preizkus bakterijske aktivnosti. Naredili smo 4 serije (COZ, COZ z DNK, 4 °C in 4 °C z DNK), v vsaki seriji pa smo opravili v časovnem obdobju 8 meritev v treh ponovitvah, naredili pa smo tudi prav toliko slepih kontrol. Rezultate smo predstavili v preglednici (Priloga D<sub>1</sub> in D<sub>2</sub>).

Alikvotom po 0,9 g tal smo dodali 15 ml 60 mM kalij- fosfatnega pufra (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH= 7,6. Vzorce smo pretresli in vorteksirali 1 min. Po 1,8 mL smo prenesli v mikrocentrifugirke ter jih centrifugirali 5 min pri 10,000 g. Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve. Izmerili smo spekter v območju od 200 – 800 nm z intervalom na vsakih 5 nm na spektrofotometru Shimadzu (NOVASPEC II). Indeks molekulske mase smo izračunali kot prej Bragazza in sod. (2006). V raziskavi so indeks molekulske mase (MWI) izračunali kot razmerje med absorbancami pri 365 nm in 250 nm. Pri valovni dolžini 365 nm merimo absorbanco za različne delce, pri valovni dolžini 250nm pa merimo proteine, DNK in podobno. Torej razmerje teh dveh absorbanc nekega vzorca nam poda MWI.

### 3.4.7 Umestitev fizikalno-kemijskih lastnosti preučevanih tal v primerjavi z drugimi tlemi

Poiskali smo nekaj člankov, kjer so podatki o fizikalno-kemijskih lastnosti različnih tal iz različnih koncev sveta in podatke zbrali v Excel tabeli (priloga A). Iskali smo podatke o odstotku peska, melja, gline, pH in količini organskega ogljika ter dušika. Med zbiranjem podatkov smo opazili, da pri večini raziskovanih tal ni bilo podatka o količini dušika, zato smo ta parameter iz primerjave izpustili. Za primerjavo smo izbrali program PAST (Hammer in sod., 2001). Podatke smo transformirali v .txt datoteko in jo uvozili v program. Podatke smo razdelili v različne skupine in sicer CE (centralno-evropska), hladna in ekvatorialna tla, ter vsako skupino ustrezno barvno označili s ukazom Edit > Row colour/symbol. Za izris grafa smo uporabili ordinacijo Non Metric MDS, uporabljena mera za oddaljenost med pari pa je bil indeks Bray Curtis. Za boljšo primerjavo smo uporabili še elipse, ki predstavljajo območje razporeditve 95 % vseh vzorcev.

a36	5,7	23	60	18	1,54
a37	6,8	21	58	22	1,37
a38	6,9	22	16	63	1,44
a39	7,4	63	33	4	1,43
a40	7,5	24	67	9	0,98
a41	7,3	36	19	45	1,48
a42	6,9	45	38	17	1,90
a43	7	36	43	21	2,90
a44	7,1	31	39	30	2,93
a45	5,4	6,9	20,1	72,2	1,5
a46	5,6	1,6	19,8	78,6	0,6
a47	5,9	1,9	20,6	77,4	2,0
a48	5,9	1,6	27,2	71,2	1,9
a49	5,1	6,9	28	65	2,1
a50	6,4	2,7	25,1	72,2	0,5
a51	6,4	1	13	85	0,9
a52	6,34	1	13	85	0,9
a53	5,46	1	13	85	1,9
a54	5,57	1	13	85	2,7
a55	5,23	1	13	85	4,1
a56	4,08	1	13	85	6,0
a57	3,64	1	13	85	7,2
a58	7,5	1	23	76	1,2
a59	7,58	1	23	76	0,5
a60	7,28	1	23	76	3,6
a61	6,34	1	23	76	5,409
a62	7,07	1	23	76	12,2
a63	5,05	1	23	76	19,3
a64	5,71	5,77	6,9	87,33	1,49
a65	4,9	9,8	5,4	84,8	0,60
a66	4,9	11,3	5,1	83,6	0,30
a67	5,77	28,97	21,57	49,47	0,27
a68	6,43	9,8	18,13	72,02	0,04
a69	6,68	12,5	12,57	74,93	0,03
a70	4,8	40	32	28	17,3
a71	6,5	25,3	16,8	57,9	0,2

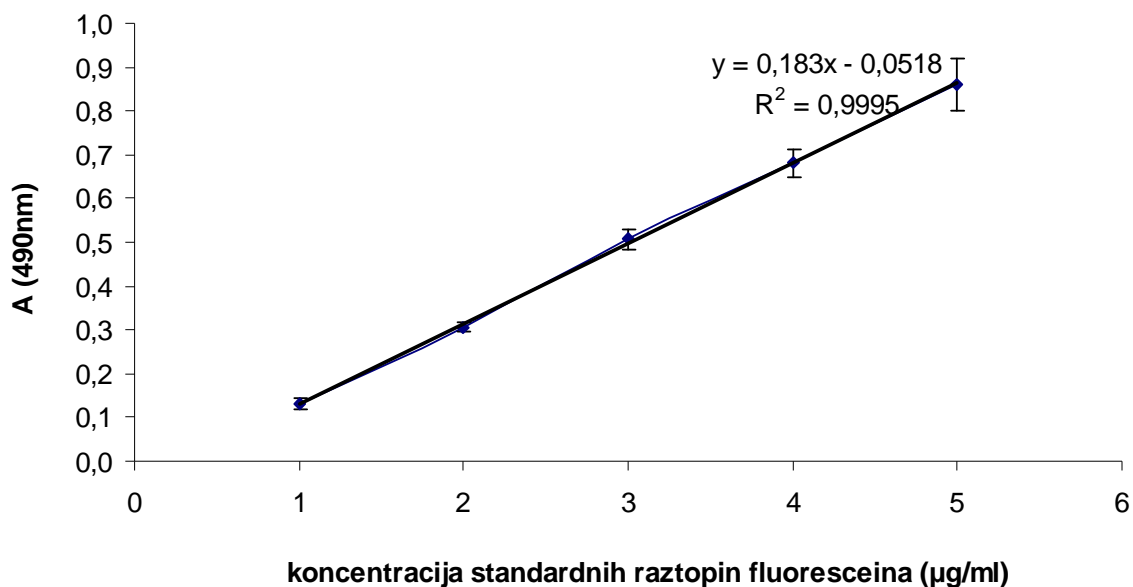
Slika 10: Izsek iz urejenih podatkov lastnosti tal v programu PAST (Hammer in sod., 2001). Barve označujejo različne tipe tal, prva kolona predstavlja vrednosti pH, sledijo tri kolone, ki po vrsti predstavljajo odstotke gline, melja in peska, na koncu pa so zbrani podatki o količini organskega ogljika v g/kg.



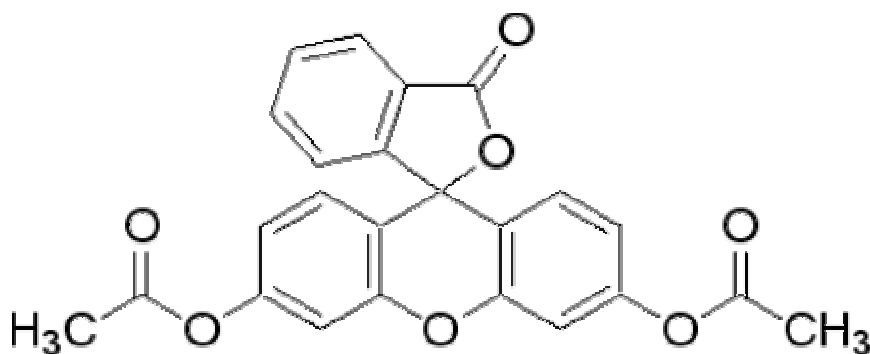
### 3.5 MERJENJE AKTIVNOSTI MIKROBNE ZDRUŽBE S FLUORESCEIN DIACETATOM

Hidroliza s fluorescein diacetatom (FDA) je natančna in enostavna metoda za določanje mikrobne aktivnosti v vseh okoljskih vzorcih. Encimi, ki so prosti ali pa vezani na membrano, hidrolizirajo brezbarven fluorescein diacetat, posledica pa je sprostitvev fluorescina in razvoj rumene barve, ki jo lahko izmerimo spektrofotometrično. Reakcijo ustavimo z dodatkom kloroform/metanol (2:1 v/v), ne da bi s tem izgubili obarvanost suspenzije (Adam in Duncan, 2001).

Naredili smo 4 serije (COZ, COZ z DNK, 4 °C in 4 °C z DNK), v vsaki seriji pa smo opravili v časovnem obdobju 8 meritev v treh ponovitvah, naredili pa smo tudi prav toliko slepih kontrol. Podatke smo zbrali v preglednico (Priloga C<sub>1</sub> in C<sub>2</sub>). Vzorec prsti smo prenesli v 50 ml mikrocentrifugirke in dodali 15 ml 60 mM kalij-fosfatnega pufra (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH= 7,6. Vzorce smo pretresli in dodali 0,2 ml FDA s koncentracijo 1 g ml<sup>-1</sup>, seveda pa smo vzporedno delali tudi slepe kontrole, v katere smo namesto reagenta FDA dodali 0,2 ml kalij-fosfatnega pufra. Mikrocentrifugirke smo inkubirali 20 min pri 30 °C, vmes pa večkrat močno pretresli. Po 20 min smo reakcijo ustavili z dodatkom 15 ml mešanice kloroform/metanol (2:1 v/v) in homogenizirali s stresanjem. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 3 min pri hitrosti 2000 obratov na minuto. Zgornji, s fluoresceinom obarvan del, smo prelili v epruvete in izmerili absorbanco pri 490 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč (BIOTEK Elx808). Vzorce smo analizirali v treh ponovitvah, prav tako tudi slepe kontrole. Koncentracijo sproščenega fluoresceina smo določili z umeritveno krivuljo, ki smo jo naredili iz standardnih koncentracij (0 do 5 µg/ml) (Slika 11).



Slika 11: Umeritvena krivulja standardnih koncentracij fluoresceina za merjenje aktivnosti mikrobnih združb.



Slika 12: Fluorescein diacetat (FDA) (Sigma Aldrich, 2010)

Opomba: poleg tehnike s fluorescein diacetatom (FDA), smo za aktivnost bakterij preizkusili tudi tehniki z redukcijo resazurina in dehidrogenazno aktivnost. Ko smo primerjali vse tri tehnike smo ugotovili, da so bili pri reakciji s FDA rezultati najboljše za nadaljno raziskovanje, saj smo pri ostalih dveh tehnikah dobili rezultate skoncentrirane okoli ene vrednosti in bi lahko o končnih rezultatih odločala le eksperimentalna napaka. Ugotovili smo, da je tehnika FDA za naš vzorec najboljše najbolj natančna.

## 3.6 TIPIZACIJA BAKTERIJSKE MIKROBNE ZDRUŽBE

### 3.6.1 Priprava biomase gojene frakcije bakterij

Gojišče NB smo pripravili v štirih alikvotih po 250 ml in jih inokulirali s 0,5 g svežih tal. Inkubacija je potekala v stresalniku pri 37 °C in hitrostjo 120 obratov na minuto. Po 72 urah smo bakterijsko biomaso skoncentrirali s centrifugiranjem in iz alikvotov ekstrahirali DNK (Ausubel in Frederic, 1987).

### 3.6.2 Izolacija skupne mikrobne DNK gojene frakcije bakterij

Peletu smo dodali 567 µl pufra TE in resuspendirali. Nato smo dodali 3 µl proteinaze K in 30 µl 10 % SDS ter dobro premešali na vorteksu. Suspenzijo smo inkubirali pol ure pri 50 °C ter vmes večkrat močno premešali na vorteksu. Po inkubaciji smo primešali 100 µl 5M NaCl in 80 µl CTAB/NaCl segretega na 65 °C in znova močno zmešali. Po 10 minutni inkubaciji na 65 °C smo dodali enak volumen kloroforma, zmešali, centrifugirali ter odstranili supernatant. Postopek smo ponovili z 0,6x volumnom mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol, nato pa še enkrat s kloroformom. Oborjeno DNK smo nato očistili z etanolno precipitacijo z 1 ml 70 % alkohola, centrifugirali ter odstranili supernatant. Dobljen pelet smo osušili ob plinskem gorilniku ter ga raztopili v 50 µl vode (Sigma) (Ausubel in Frederic, 1987).

### 3.6.3 Izolacija skupne mikrobne DNK iz tal

Skupno mikrobno DNK smo ekstrahirali s kompletom UltraClean Soil DNA Isolation Kit po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno elektroforezo v 1 % gelu. Po ločevanju smo gel obarvali s etidijevim bromidom. (Frostegard in sod., 1999; Stres in Tiedje, 2006; Bakken in Frostegard, 2006; Courtois in sod., 2001).

### 3.6.4 Merjenje koncentracije DNK

Koncentracijo DNK smo določili spektrofotometrično v 1,5 µL alikvotih (NanoDrop 1000; Thermo Scientific).

### 3.6.5 Verižna reakcija s polimerazo

Pomnoževali smo približno 900 bp dolg del bakterijskega gena za 16S rDNK. Začetni oligonukleotid 27f je bil označen s fluorokromom 6- FAM, začetni oligonukleotid 927R pa je ostal neoznačen. Za pomnoževanje tega gena smo v 25 µl reakciji uporabili:

<b>MIX</b>	<b>volumen</b>	<b>končna koncentracija</b>
- pufer za polimerazo 10x	2,5 µl	1x
- MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl	2,5 mM
- dNTP (10 mM)	0,5 µl	200 µM
- 6- FAM- 27f (10 µl)	0,5 µl	200 nM
- 927R (10 µl)	0,5 µl	200 nM
- <i>Taq</i> polimeraza (5U/ µl)	0,2 µl	1U
- voda (SIGMA)	do 25 µl	
- matrična DNK	1 µl	

Pomnoževanje smo izvedli po sledečem protokolu:

- začetna denaturacija DNK pri 95 °C, 5 min
- denaturacija pri 95 °C, 1 min
- prileganje oligonukleotidov pri 52 °C, 1 min
- podaljševanje pri 72 °C, 1 min
- končno podaljševanje pri 72 °C, 10 min
- hlajenje pri 4 °C

Denaturacijo, prileganje in podaljševanje smo opravili v 30 ponovitvah. Po potrebi smo vzorce DNK redčili 1: 10 ali 1: 100. Rezultate smo preverili na 1 % agaroznem gelu v elektroforetski banjici, velikost pomnoženega dela pa smo preverili s standardno velikostno lestvico.

### **3.6.6 Optimizacija reakcije PCR**

PCR je reakcija pri kateri se s spremembami temperature odvijajo različni procesi v PCR mešanici. Na začetku smo imeli s pomnoževanjem težave, saj nam nikakor ni uspelo pomnožiti podvojenih odsekov. Sprva smo poskusili z menjavo reagentov. Najprej smo zamenjali pufer za polimerazo,  $MgCl_2$  in dNTP-je. Ker to ni pomagalo smo poskusili zamenjati tudi začetne nukleotide. Tudi to ni imelo učinka, zato smo poskusili še z menjavo polimeraze. Tudi ta sprememba ni pripomogla k podvojevanju, zato smo se odločili narediti nekaj sprememb pri temperaturah. Ugotovili smo, da je bila težava v temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov, kajti ko smo temperaturo prileganja začetnih vzorcev spustili za 1 °C (na 52 °C), je reakcija potekla. Poleg tega pa je bila v nekaterih vzorcih koncentracija DNK previsoka. Posledica je prebitok DNK v mešanici in reakcija ne poteče. Poskus nam je uspel šele po 10x ali 100x redčenju.

### **3.6.7 Čiščenje produktov PCR**

Ker bi ostanki pufrov iz PCR lahko ovirali nadaljnje reakcije, smo produkte pred restrikcijo očistili s kompletom za čiščenje PCR produktov (High Pure PCR Product Purification Kit) po navodilih proizvajalca (Roche Applied Science, 2009).

### **3.6.8 Restrikcija z endonukleazo *HaeIII***

Poznamo več vrst encimov- lahko so specifični ali pa nespecifični, po kemični strukturi pa so proteini.

V restrikcijsko mešanico smo dodali toliko pomnožka PCR, da je bilo v njej približno 50 ng DNK, 10U tetramerne endonukleaze *HaeIII*. Restrikcijski encim smo izbrali glede na predhodnjo analizo sekvenc 16S rRNK s programom BESTRF (Stres in sod., 2009). Cepitev je potekala preko noči na 37 °C, po cepitvi pa smo restrikcijsko mešanico inaktivirali 15 min pri 80 °C (Stres in sod., 2008). Po cepitvi smo ponovno čistili s kompletom za čiščenje PCR produktov (High Pure PCR Product Purification Kit) po navodilih proizvajalca (Roche Applied Science, 2009).

### **3.6.9 Ločevanje fluorescentno označenih restrikcijskih odsekov s kapilarno elektroforezo ABI 3130XL**

Alikvote (2 µl) inaktivirane restrikcijske mešanice smo zmešali z 2 µl deioniziranega formamida, 0,5 µl pufru za nalaganje in 2 µl DNK standarda (TAMRA 1000 fragment length standard, PE Biosystems). Preden smo vzorce naložili, smo jih denaturirali 5 min pri 94 °C in jih takoj ohladili na ledu. Alikvote po 2,5 µl smo pod standardnimi pogoji proizvajalca elektrokinetično injecirali v kapilarno elektroforezo.

### **3.6.10 Analiza kromatogramov**

Elektroferograme smo uvozili v program BioNumerics in jih analizirali. Dendrogram izhaja iz grških besed »dendrus«, ki pomeni drevo in »-gramma«, ki pomeni risanje in nam prikaže sorodstveno povezanost med podatki, ki jih raziskujemo. Najprej smo morali v programu odpreti svojo mapo, nato smo podatke uvozili iz mape v računalniku. Te podatke smo pretvorili v digitalizirano obliko, ki omogoča opredelitev pasov, z markerjem asistirano normalizacijo, nadomestilo za intenzivnost razlik med pasovi in dodelitev različnih pasov znotraj vsakega pasa (Stres in sod., 2008; Likar in sod., 2009).

Uporabljali smo tudi še nekatera druga orodja, ki so na voljo v tem programu za boljše razumevanje analize pridobljenih podatkov. Kofenetska korelacija je tudi parameter za izražanje skladnosti skupine. Ta način izračuna korelacijo med podobnostmi pridobljenimi iz dendrograma in podobnostmi iz matrike. Vrednost se ponavadi izračuna za celoten dendrogram, da dobimo oceno pravilnosti analize skupine. Linija napake je sestavljena za vsako vejo posebej. Povprečna podobnost in točen standardni odklon je prikazan na položaju kazalke. Krajša je linija napake, bolj podobna je skupina. Še en način opazovanja dendrogramov je, da bi poskušali omejiti ustrezne skupine. Najpreprostejša in najboljša metoda je, da nariše navpičnico skozi dendrogram tako, da ne preseka najbolj homogenih skupin iz heterogenih skupin. Cluster cut-off metoda je ena izmed statističnih metod, ki nariše črto skozi dendrogram glede na določeno stopnjo podobnosti. Nastane nova, poenostavljena, podobna matrica, v kateri so vse vrednosti znotraj ene skupine 100 %, med skupinami pa 0 % (Applied Maths, 2010).

### 3.7 MATERIALI

#### 3.7.1 Reagenti

- Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- agaroz (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- CaCl<sub>2</sub> (Bethesda Research Laboratories)
- CTAB/ NaCl (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- deionizirani formamid (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- dH<sub>2</sub>O
- dNTP set (MBI Fermentas, Litva)
- etanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- FDA- fluorescin diacetat
- fenol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- GeneRuler™ DNA Ladder Mix, (MBI Fermentas, Litva)
- glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- izoamilalkohol (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- KCl (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- klorofom (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- KPK (R1+ R2)
- metanol (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Litva)
- Na- acetat (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Na- sukcinat (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)



- NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- NaOH (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- natrijev citrat (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- Nutrient Broth (BIOLIFE)
- PAHBAH (hidrazid parahidroksi benzojeva kislina, Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- SDS (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- SIGMA voda (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- TAMRA 1000 fragment length standard (PE Biosystems, UK)

### **3.7.2 Kompleti**

- UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Solana Beach, California)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

### **3.7.3 Encimi**

- Taq polimeraza s pripadajočim 10x pufrom B in MgCl<sub>2</sub>, (Promega, Madison, WI, ZDA)
- *Hae*III s pripadajočimi pufri (*Bsu*RI, GG'CC, MBI Fermentas, Litva)
- proteinaza K (MBI Fermentas, Litva)

### **3.7.4 Pufri in raztopine**

- TBE (Tris- Borat- EDTA- electrophoresis buffer)
- Tris Base
- boratna kislina (Merck KgaA, Darmstadt, Germany)
- EDTA (etilen- diamin- tetraacetic- acid) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- pufer TE
- Tris- Cl (pH= 7,4)

- EDTA (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- etidijev bromid (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany)
- kalij- fosfatni pufer ( $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ )
- nalagalni pufer za gelsko elektroforezo- LB (MBI Fermentas, Litva)
- velikostna lestvica (GeneRuler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, Litva)
- R1: v 500 ml dH<sub>2</sub>O raztopi 10,216 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (sušenega 2 h pri 105 °C). Dodaj 167 ml koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in dopolni z destilirano vodo do 1 l
- R2: 10 g Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> raztopi v 1 l koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. R1 in R2 previdno in počasi zmešaj v razmerju 1,5:3,5 en dan pred uporabo, ker se reagent močno segreje.
- R1 za slepo probo: 1,67 ml koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodaj destilirano vodo do 10 ml.

### 3.7.5 Začetni oligonukleotidi

- 27f- FAM:\* 5' 6-FAM- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',  $T_m = 51,6^\circ C$
  - Pol 927R:\* 5'-ACC GCT TGT GCG GGC CC-3'  $T_m = 46,5^\circ C$
- oba\* (MWG Biotech AG)

### 3.7.6 Gojišča

NB brez nitrata: (za 1000ml)

- Nutrient broth 10 g
- Na- sukcinat 0,5 g
- Na- acetat 0,5 g
- Deionizirana voda do 1000 ml
- pH 6,5- 6,8

## 4 REZULTATI

### 4.1 ZNAČILNOSTI EKSPERIMENTALNIH TAL IN PRIMERJAVA Z DRUGIMI TLEMI

#### 4.1.1 Osnovne fizikalno-kemijske lastnosti proučevanih tal

	v1	v2	v3	povprečje
<b>vlažnost (%)</b>	69,0±18,1	33,7±18,1	44,8±18,1	49,17±18,1
<b>pH aktiven</b>	7,42±0,03	7,37±0,03	7,38±0,03	7,39 ±0,03
<b>pH potencialen</b>	7,31±0,06	7,19±0,06	7,22±0,06	7,24 ±0,03
<b>GP (%)</b>	12,1±1,1	13,5±1,1	14,2±1,1	13,2±1,1
<b>G (%)</b>	15,3±0,4	14,6±0,4	14,5±0,4	14,8±0,4
<b>FM (%)</b>	21,7±1,2	23,3±1,2	24,0±1,2	23,0±1,2
<b>GM (%)</b>	11,8±3,2	7,3±3,2	5,5±3,2	8,2±3,2
<b>FP (%)</b>	39,1±1,4	41,3±1,4	41,8±1,4	40,8±1,4
<b>P (%)</b>	51,2±2,5	54,8±2,5	56,0±2,5	54,0±2,5
<b>M (%)</b>	33,5±2,1	30,6±2,1	29,5±2,1	31,2±2,1
<b>DOC (mg org.C/g tal)</b>	116,8	158	136	136,9± 20
<b>RS (mg org.C/g tal)</b>	0,558	0,627	0,558	0,581± 0,04

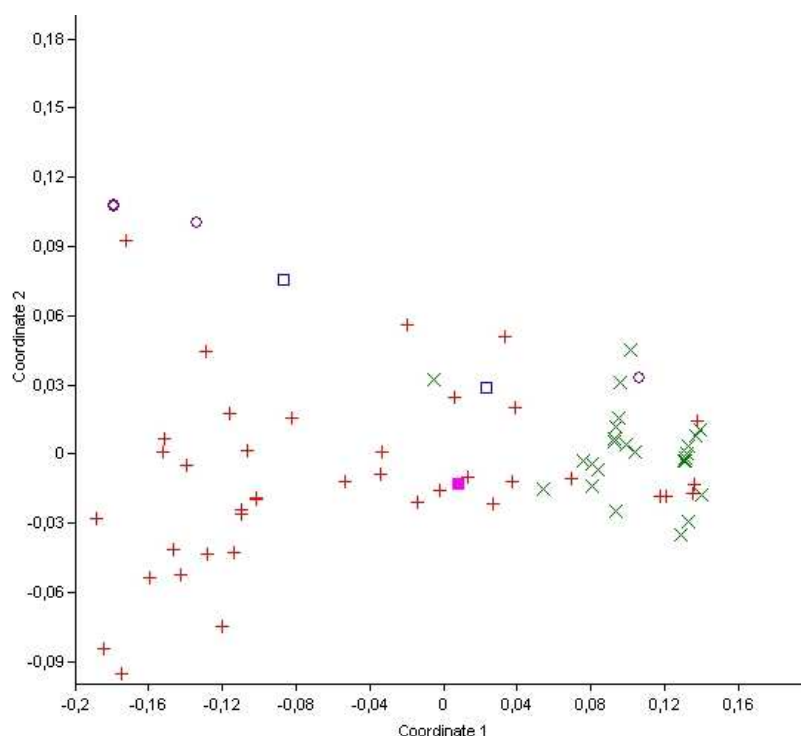
**Preglednica 1:** Izmerjene fizikalno-kemijske lastnosti tal v treh neodvisnih ponovitvah. Napake predstavljajo eno standardno deviacijo. P- pesek, GP- grobi pesek, FP- fini pesek, G- glina, M-melj, FM- fini melj, GM- grobi melj. DOC- raztopljen organski ogljik. RS- redukcijski sladkorji.

Ugotovili smo, da v našem vzorcu prevladuje predvsem pesek in sicer v kar 54 %. Preostalo sestavo naše mineralne zemlje sestavljajo melj s približno 31 % in glina s 15 %, pH se giblje rahlo nad nevtralnimi, vrednosti raztopljenega organskega ogljika so v povprečju 137 mg org. C/g tal, redukcijskih sladkorjev pa 0,6 mg org. C/ g tal (Preglednica 1). Po teksturnem trikotniku (Slika 7) se torej naša tla uvrščajo med peščeno ilovico (PI), vendar so že bolj na meji s peščeno glinasto ilovico (PGI). Rezultate smo primerjali z rezultati nekaterih podobnih raziskav in ponovno ugotovili podobnost. Tudi pri raziskavi Lenarčiča (2005) so ugotovili zelo podobno sestavo mineralnih tal.

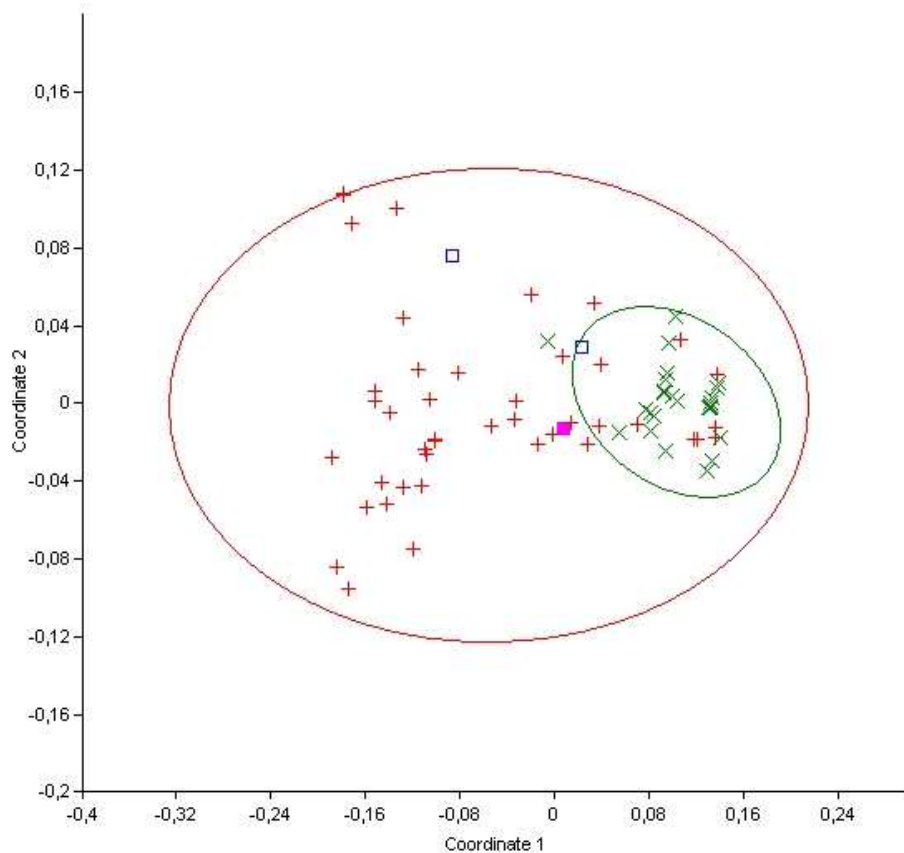
#### 4.1.2 Umestitev fizikalno-kemijskih lastnosti proučevanih tal v primerjavi z drugimi tlemi

Razlike med različnimi tipi tal v osnovnih fizikalno kemijskih dejavnikih smo prikazali v ordinaciji (Slika 13). Za primerjavo smo zbrali podatke za 64 različnih vzorcev tal iz srednje Evrope (CE), hladnih tal (Alpe, Himalaja, Svalbard) ter ekvatorja (Brazilija, Kenija) (Priloga A).

Iz obeh prikazov je razvidno, da obravnavani vzorec od ostalih bistveno ne odstopa, saj se uvršča v samo sredino elipse srednjeevropskih tal (Slika 14), vendar pa ni vključen v elipso, kjer so zbrani vzorci tal iz hladnejših področij. To kaže na primerljivost osnovnih fizikalno-kemijskih dejavnikov obravnavanih tal z ostalimi tlemi kmetijskih površin srednje Evrope.



**Slika 13: Ordinacija z NM-MDS osnovnih fizikalno- kemijskih lastnosti tal (Priloga A). Ordinacijo smo izračunali v programu za statistično obdelavo podatkov PAST (Hammer in sod., 2001). Uporabljena mera za oddaljenost med pari je bil indeks Bray-Curtis. (x) hladna tla; (+) tla centralne Evrope; (■) modelna tla uporabljena v tej študiji; (○) – Ljubljansko barje; (□) – ekvatorialna tla.**

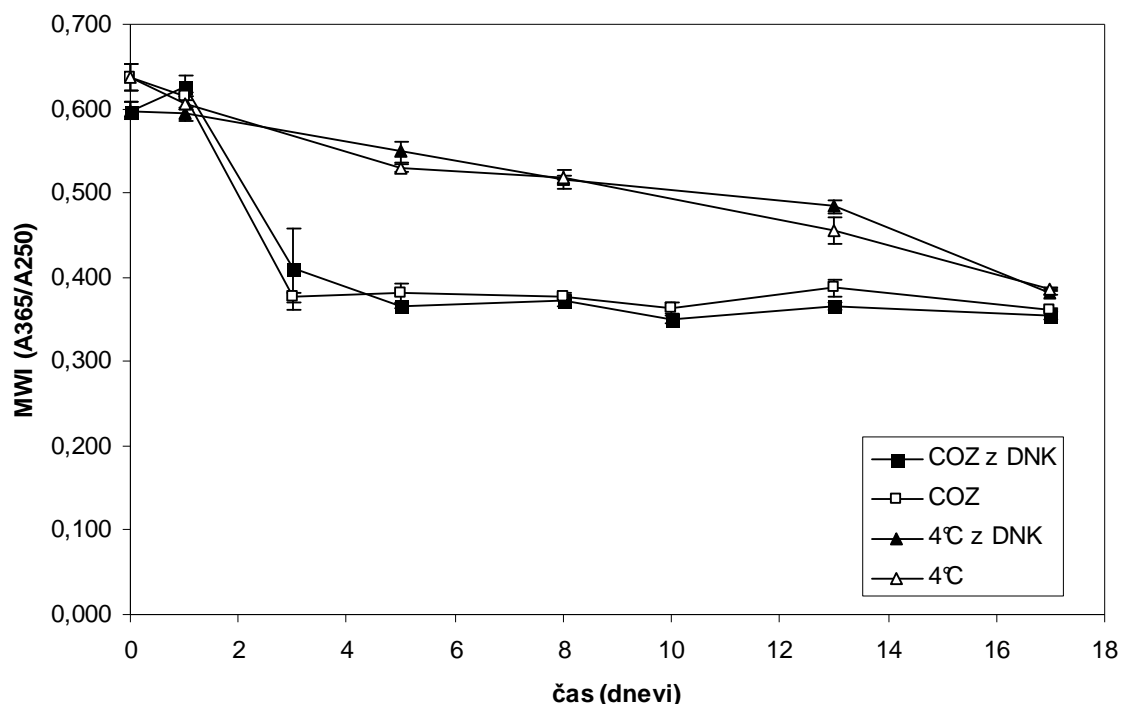


**Slika 14: Primerjave treh skupin tipov tal (hladna, ekvatorialna, srednje evropska). Elipse predstavljajo območje razporeditve 95 % vseh vzorcev. Uporabljena mera za oddaljenost med pari je bil indeks Bray-Curtis. (x) hladna tla; (+) tla centralne Evrope; (□) ekvatorialna tla; (■) modelna tla uporabljena v tej študiji.**

## 4.2 EKSPERIMENT

Po izolaciji DNK iz gojene frakcije mikrobnih združb je bila izmerjena koncentracija raztopljenе DNK  $2,85 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{ml}$ . DNK smo razredčili in jo v alikvotih dodali v vzorce tal označene  $4^\circ\text{C}$  z DNK in COZ z DNK. Končna koncentracija DNK v dodanih alikvotih je bila  $7,125 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  vode. Ker nas je zanimal delež dodane DNK v vzorcu, smo morali narediti nekaj izračunov. Predvideli smo, da je bila koncentracija bakterij  $4,6 \times 10^8$  celic/ g tal, kot so prej na istih tleh ugotovili Stres in sod. (2010). Upoštevali smo tudi podatek, da je količina okoljske DNK na celico v tleh  $2,4 \times 10^{-15}$  g, količina gojene pa je  $8 \times 10^{-15}$  g na celico (Bakken in Olsen, 1989; Christensen in sod., 1995, Christensen in sod., 1993). V vzorec smo dodali DNK s koncentracijo  $7,125 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  vode, kar predstavlja  $6,697 \mu\text{g}/\text{g}$  tal vzorca. Ta DNK je bila izolirana iz gojenih celic, zato smo njeno količino v vzorcu delili s predvideno maso DNK na celico kar predstavlja  $8 \times 10^{-15}$  g. Kot rezultat dobimo število celic na g tal in sicer  $8,37 \times 10^8$  gojenih celic/ g tal. Ker pa v okolju ni celic, ki bi imele tako veliko količino DNK, smo naredili izračun še za število okoljskih celic iz katerih lahko izoliramo  $6,697 \mu\text{g}/\text{g}$  tal vzorca DNK. Tukaj je številka malo večja in sicer  $27,9 \times 10^8$  celic/ g tal. Sledil je končni izračun: vemo, da dodana DNK ustreza  $8,37 \times 10^8$  gojenih celic/ g tal in da je koncentracija bakterij v tleh  $4,6 \times 10^8$  celic/ g tal. Zato izračunamo delež DNK gojenih celic/ g tal v vzorcu od vsote znanega števila celic v okolju ( $4,6 \times 10^8$  celic/ g tal) in števila gojenih celic, ki ustrezajo koncentraciji dodane DNK ( $8,37 \times 10^8$  gojenih celic/ g tal) in ugotovimo, da znaša približno 64%. Enako naredimo še v drugem primeru, ko upoštevamo, da  $6,697 \mu\text{g}/\text{g}$  tal ustreza  $27,9 \times 10^8$  celic/ g tal in dobili, da je v tem primeru delež mnogo višji in sicer približno 86%. Ta izračun smo naredili tudi zato, ker vemo, da znajo podatki o količini DNK na celico zelo varirati, poleg tega pa smo najprej prikazali najslabši možni scenarij, ko bi bile vse celice popolne, pa še vedno znaša delež dodane DNK gojenih celic kar 64 %. Takšna količina DNK bi se mogla na T-RFLP precej poznati, kaj šele 86 %. Eksperimentalna tla z in brez dodatka DNK smo nato izpostavili konstantni inkubaciji pri  $4^\circ\text{C}$  ali COZ.

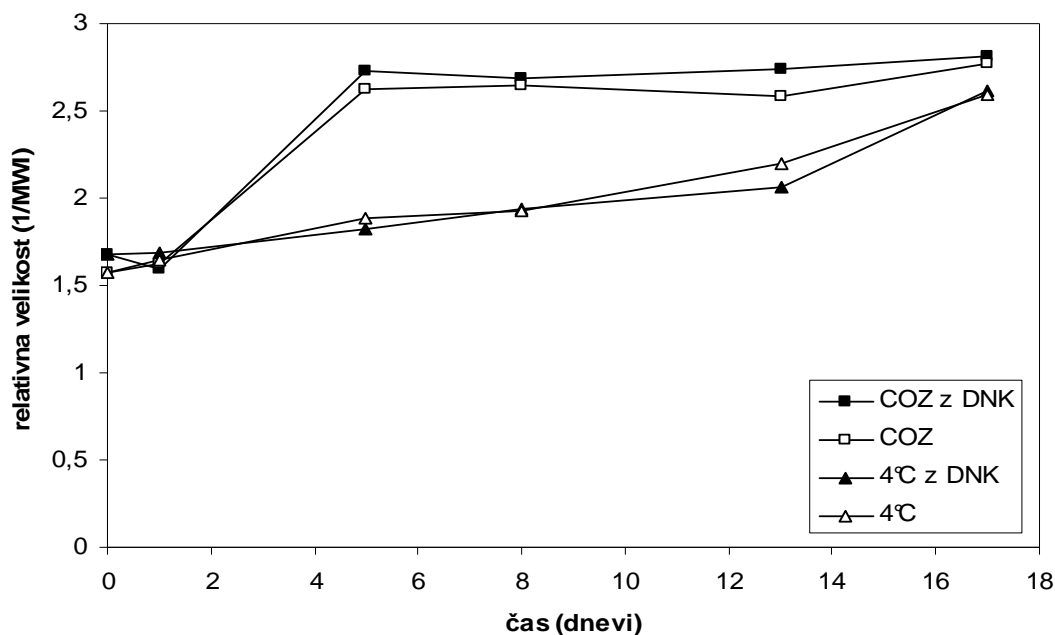
#### 4.2.1 Spreminjanje velikosti molekul v vodi topne organske snovi v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali COZ) in prisotnosti/odsotnosti zunajcelične DNK



Slika 15: Spreminjanje indeksa molekulske mase v vodi raztopljenih organskih snovi v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali COZ) ter dodajanja zunajcelične DNK. Napake predstavljajo eno standardno deviacijo. Indeks molekulske mase je obratno sorazmeren z molekulsko maso (Slika 16).

Iz grafa (Slika 15) je razvidno, da pri COZ že zelo hitro po prvem COZ obe premici pričneta strmo padati, nato pa se ustalita. To pomeni, da se MWI (molecular weight index) zniža, to pa ne pomeni nič drugega, kot da se organska snov v vzorcu kompleksira, saj je indeks molekulske mase obratno sorazmeren z molekulsko maso. Tudi pri poskusu pri 4 °C lahko vidimo nižanje indeksa molekulske mase. Tudi tukaj lahko trdimo, da se molekulska masa povečuje tekom poskusa. Pri obeh serijah torej vidimo, da se organska snov med poskusom kompleksira. Ta nenaden upad indeksa molekulske mase bi lahko razložili s tem, da pri COZ 50 % celic počne pride do njihove lize (Stres in sod., 2010; Elliot in Henry, 2009; Soulides in Allison, 1961; Henry, 2007). V prst se sprosti ogromno število najrazličnejših organskih molekul, ki nato služijo mikroorganizmom kot hrana. Tako pretvarjajo organske ogljikove spojine v smeri kompleksnejših rekalcitrantnih spojin, v končni fazi v huminske kisline. Ker je morda težje razumeti Sliko 15 in ker vemo, da je

MWI obratno sorazmerno z molekulsko maso, smo naredili graf  $1/MWI$ , na katerem imamo pravzaprav direktni pregled višanja molekulske mase v poskusu (Slika 16).



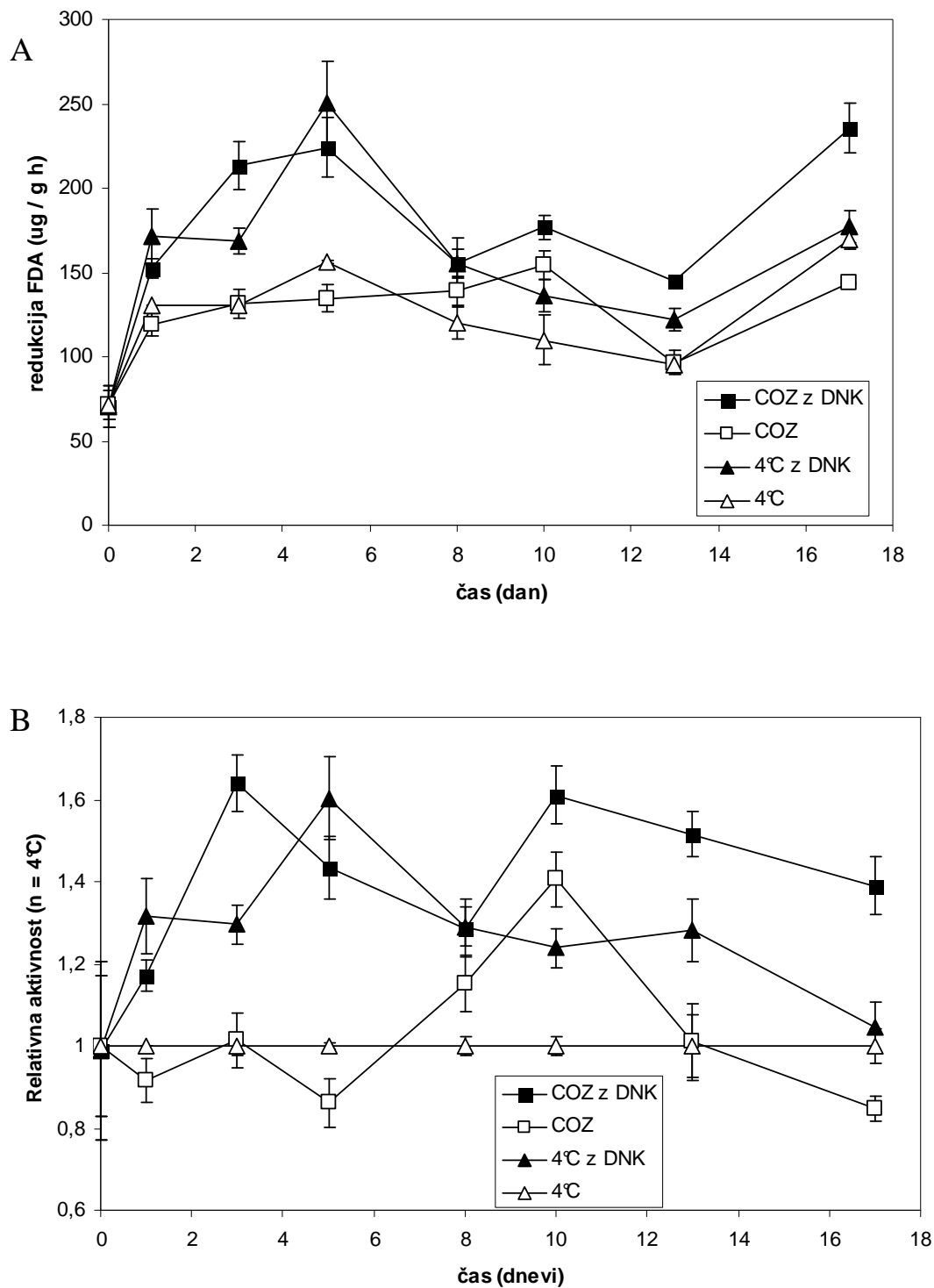
Slika 16: Shematski prikaz večanja molekulske mase v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO<sub>2</sub>) ter dodajanja zunajcelične DNK. Napake predstavljajo eno standardno deviacijo.

#### 4.2.2 Aktivnost mikrobne združbe (FDA) v odvisnosti od načina inkubacije (4 °C ali CO<sub>2</sub>) in prisotnosti/odsotnosti zunajcelične DNK

Kot smo že prej omenili, je hidroliza z fluorescein diacetatom (FDA) natančna in enostavna metoda za ugotavljanje mikrobne aktivnosti v vseh okoljskih vzorcih. Encimi, ki so prosti ali pa vezani na membrano, hidrolizirajo brezbarven fluorescein diacetat, posledica pa je sprostitve fluoresceina in razvoj rumene barve, ki jo lahko izmerimo s spektrofotometrom. S pomočjo umeritvene krivulje znanih koncentracij fluoresceina (Slika 11) smo preko s spektrofotometrom izmerjene absorbance izračunali količino hidroliziranega fluoresceina v eni uri v vzorcih (Priloga C in D) in s tem aktivnost bakterij



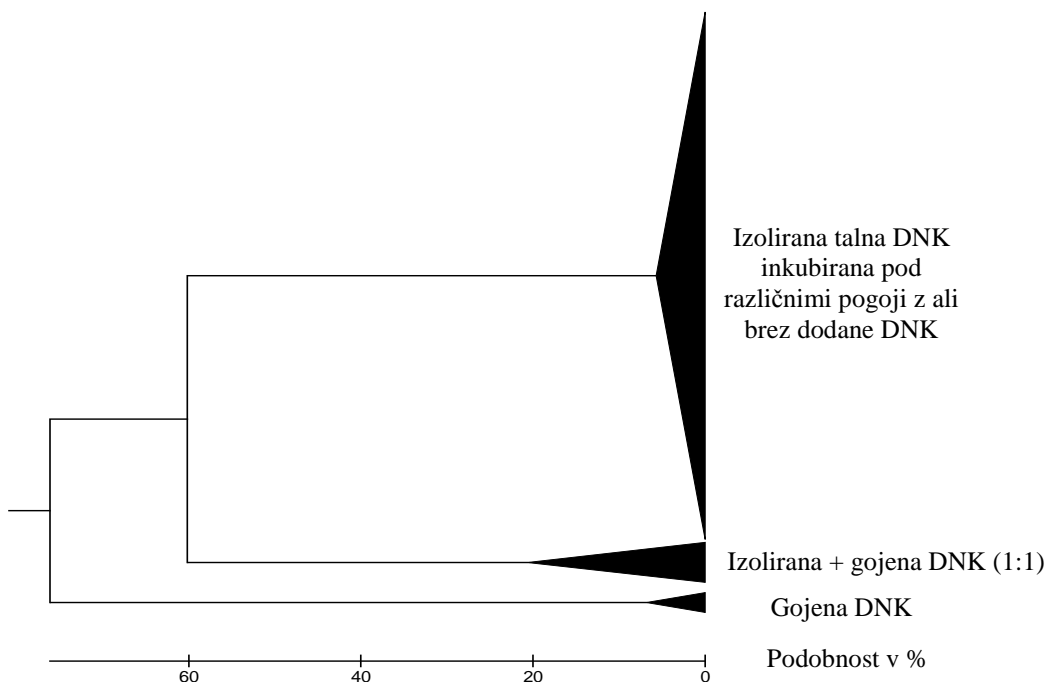
v različnih časovnih obdobjih in pogojih (Slika 17A). Skoraj vseskozi je bila aktivnost pri vzorcih z dodano DNK višja kot v vzorcih brez dodane DNK v vseh meritvah. Če pa medsebojno primerjamo seriji COZ in 4 °C vidimo, da je bila aktivnost v večini meritev višja pri COZ. Zanimivo je, da je aktivnost pri vseh vzorcih z dodano DNK dosegla vrhunec peti dan, nato se je aktivnost malce znižala, sedemnajsti dan pa se je znova precej povišala. Za lepši pregled dogajanja, smo naredili še en graf, kjer smo aktivnost primerjali glede na serijo 4 °C brez DNK (Slika 17B).



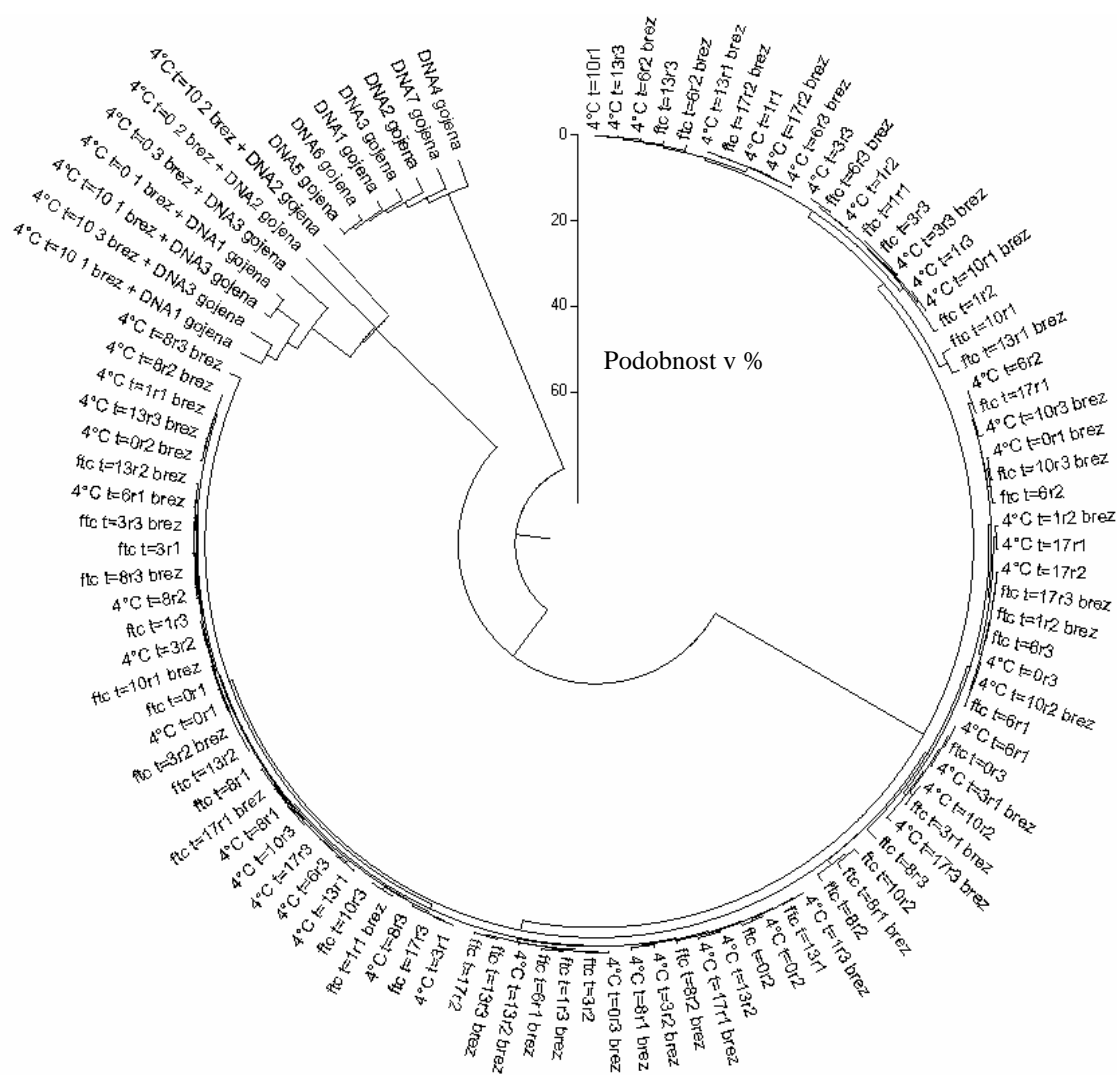
Slika 17: Mikrobná aktivnost v tleh merjena s hidrolizo fluorescein diacetata (FDA) pri različnih pogojih inkubacije (4 °C, COZ, brez dodane DNK, z dodano DNK) (A) in relativne mikrobne aktivnosti normirane na aktivnost izmerjeno za vzorce inkubirane pri 4 °C brez dodane DNK (B). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

### 4.3 TIPIZACIJA BAKTERIJSKE MIKROBNE ZDRUŽBE

Iz celokupnega dendrograma (Slika 18) je razvidno, da so si vsi vzorci inkubiranih tal zelo podobni, ne glede na inkubacijo pri 4 °C, COZ, prisotnost oz. odsotnost ekstracelularne DNK in čas inkubacije. Ti profili tvorijo homogeno skupino (podobnost > 95 %) (Slika 20). Od te skupine najbolj odstopa skupina profilov gojljivih mikrobnih združb (podobnost < 25 %) (Slika 19). Tretjo vmesno skupino predstavlja mešanica izolirane DNK iz gojene frakcije in DNK inkubiranih tal. Na dendrogramu (Slika 18) imamo pod skupino izolirana DNK vse vzorce, ki smo jih inkubirali na 4 °C ali COZ in ki smo jim dodali DNK ali ne. Pod pojmom gojena DNK je DNK izolirana iz gojene frakcije bakterij.

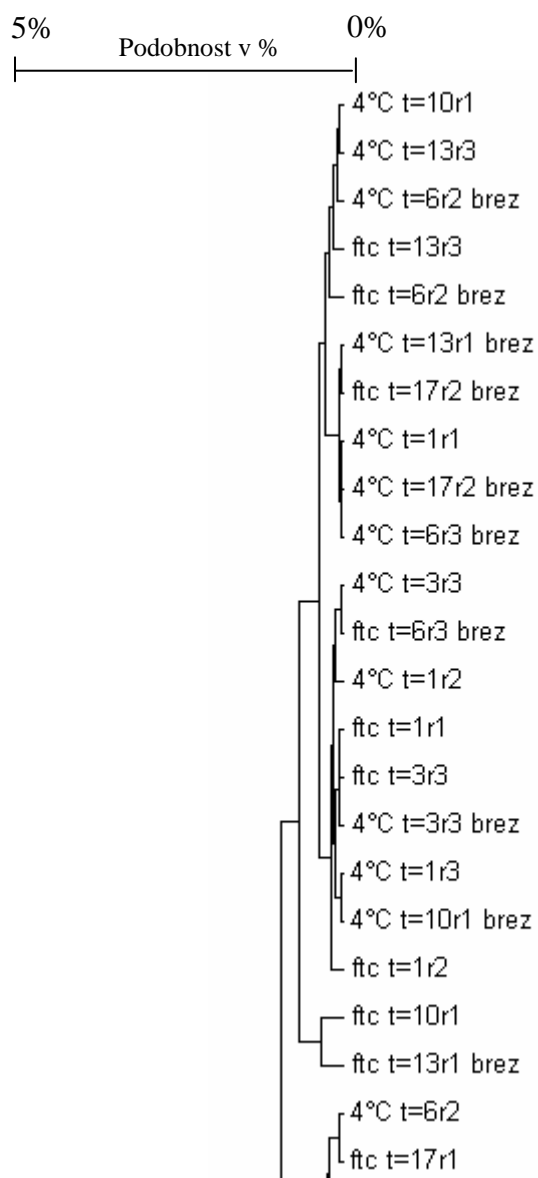


**Slika 18:** Podobnost mikrobnih združb v tleh, ki so bila izpostavljena različnim pogojem inkubacije (4 °C ali COZ) in dodatkom DNK iz tal (DNK izolirana iz gojene frakcije). Poleg sta prikazani združbi, ki smo ju dobili z mešanjem DNK mikrobnih združb (izolirana) ter DNK ekstrahirane iz gojljive frakcije ter struktura zgolj mikrobne združbe gojljive frakcije mikrobnih združb (gojena DNK) (Tamura in sod., 2007).



**Slika 19: Podroben prikaz podobnosti mikrobnih združb vseh vzorcev (iz Slika 18) (Tamura in sod., 2007).**

Vzorci smo označevali tako: najprej način inkubiranja (4 °C ali FTC- kasneje smo prevedli v slovensko kratico COZ), nato čas gojenja (npr. t= 10), sledi ponovitev (npr. r3- tretja ponovitev) in ali smo dodali DNK ali ne.



**Slika 20:** Insert iz celokupnega dendrograma izoliranih mikrobnih združb, ki kaže, kako podobne so si zaznane mikrobne združbe z dodano DNK ali brez nje, COZ ali inkubacijo pri 4 °C (Tamura in sod., 2007).

## 5 SKLEPI

- Dodatek DNK iz gojene biomase poveča mikrobovno aktivnost ne glede na CO<sub>2</sub> ali 4 °C, kar kaže na to, da je mikrobom v dostopni obliki. Torej ni nedostopno vezana na delce tal in lahko dodano DNK ekstrahiramo.
- Bakterijska aktivnost je bila skoraj vseskozi višja pri CO<sub>2</sub> z dodano DNK iz gojene biomase, kot pri 4 °C z dodano DNK, kar kaže, da CO<sub>2</sub> izboljša dostopnost, količino ali kvaliteto hranil. Zato lahko našo prvo ničto hipotezo, da nihanje preko zmrišča ne vpliva na aktivnost mikrobne združbe, zavržemo.
- Inkubacija pri 4 °C ali CO<sub>2</sub>, z dodatkom DNK iz gojene biomase, ki ustreza DNK 64 % prisotne združbe, ali brez, ne vpliva na rezultate dobljene s tehniko T-RFLP. Kljub spremembam v aktivnosti, številu celic in DOC, tehnika T-RFLP ne pokaže nobenih sprememb.
- Modelna tla so po osnovnih fizikalno-kemijskih parametrih podobna mnogim drugim srednje evropskim obdelovanim tlem. Hladna tla predstavljajo relativno homogeno podmnožico. Izbrana tla so torej dober model, naše rezultate pa lahko posplošimo tudi širše. Naše druge ničte hipoteze ne moremo zavreči.
- Struktura mikrobnih združb inkubiranih tal in gojene frakcije mikrobne združbe se signifikantno razlikujeta, prav tako pa se močno razlikujeta od strukture mešanic obeh DNK. Zato lahko našo tretjo ničto hipotezo zavržemo in sprejmemo alternativno hipotezo.

## 6 RAZPRAVA

Tla so poseben tip naravnega okolja, kjer najdemo veliko vrstno raznolikost mikroorganizmov. Poleg bakterij najdemo v tleh še glive, alge, viruse, protozoje. Tudi koncentracija mikroorganizmov v tleh je precej velika:  $10^6$  do  $10^9$  na gram tal (Alexander, 1997). Ponavadi je limitni faktor za rast ravno dostopnost hranil, zato v tleh vsakodnevno poteka kompeticija za hranilne snovi. Mikroorganizmi imajo v tleh zelo pomembno vlogo. Vsaka kemijska transformacija vključuje njihovo aktivno sodelovanje, lahko povečajo količino hranil, producirajo različne spojine (vitamini, hormoni), ki pospešujejo rast rastlin, nekateri so patogeni za rastline, lahko so antagonisti patogenom in tako preprečujejo okužbe rastlin, lahko sintetizirajo spojine, ki stimulirajo naravne obrambne mehanizme proti patogenom (biopesticidi).

Ugotovili smo, da je pH našega vzorca tal, ki smo ga odvzeli na eksperimentalnem polju pri Biotehniški fakulteti, nevtralen in je imel vrednost približno 7,4. Potencialni pH je po pričakovanju nekoliko nižji, saj smo s KCl sprostili nekatere ione, ki doprinesejo h kislosti, vendar je bila tudi ta vrednost še vedno v nevtralnem območju. Morda bi bilo za obdelovana tla dobro, da bi bil pH za kakšno stopnjo nižji, saj bi bile hranilne snovi za mikrobo in rastline v takšnem primeru lažje dostopne (Sylvia in sod., 1999). Rezultate smo primerjali tudi z raziskavami podobnih tal in ugotovili, da se vrednosti pH ujemajo.

Pri ugotavljanju vlažnosti tal smo dobili po koncu eksperimenta, med vzporednimi vzorci, vrednosti, ki so se medsebojno precej razlikovale, povprečno vlažnost tal pa smo izračunali na 49,2 %. Če upoštevamo dejstvo, da je na Ljubljanskem barju vlažnost v marcu od 55-95 % (Zajec, 2004) in da so barja bolj vlažna kot obdelovana tla, poleg tega pa je bila ta raziskava opravljena po taljenju snega in dežju, lahko tudi našo vlažnost razložimo z dejstvom, da je bil vrhnji del tal na dan jemanja vzorca rahlo namočen, saj je prejšnjo noč deževalo, zjutraj pa rahlo pršilo. Vzorec smo seveda shranili tako, da voda ni mogla izhlapevati in se tla niso mogla izsušiti. Razliko v vlažnost pa lahko razložimo z dejstvom, da se obdelovana tla razlikujejo po poroznosti od metra do metra in niso bila povsod enako

vlažna, zato je takšen rezultat čisto možen. Poleg tega so obdelovana tla znana po svojih mikronišah, ki se lahko medsebojno precej razlikujejo v fizikalnih pogojih.

Tekstura tal je fizikalni parameter, ki nam pove sestavo tal. Ugotovili smo, da je v našem vzorcu obdelovanih tal največ peska. Takšna tekstura ima veliko manjših por in posledično veliko površino kamor se lahko pripenjajo bakterije, zato so takšna tla ponavadi bogata z bakterijami. Glede na to, da smo rezultate primerjali z rezultati Lenarčiča (2005) in da smo prišli do precej podobnih rezultatov, smo lahko z njimi zadovoljni.

Zanimala nas je tudi koncentracija organske snovi v vzorcu, ki smo jo merili s testom KPK, ki predstavlja vrednostporabe kisika pri kemični oksidaciji na liter vode. Ugotovili smo, da je koncentracija organske snovi kar velika, kajti če jo primerjamo z vrednostmi organsko bogatimi vodami (Ileršič, 2007) vidimo, da je vsebnost KPK 245 mg/l, v našem vzorcu pa je 135,7 mg/ml, to je skoraj 1000-krat več. To ni nič nenavadnega saj vemo, da so obdelovana tla zelo bogata z organsko snovjo. Tudi skupna koncentracija sladkorjev, ki smo jo merili s PAHBAH tehniko je bila razmeroma visoka. Z merjenjem koncentracije raztopljenega organskega ogljika lahko rečemo, da so naša mineralna tla resnično polna organske snovi. Izmerili smo tudi velikost delcev in prišli do zanimivih ugotovitev. Pri obeh serijah lahko trdimo, da se organska snov med poskusom kompleksira, saj se je MWI zmanjševal takoj po začetku inkubacije. Stres in sod. (2010) so pokazali, da med prehajanjem preko zmrzišča počni približno 50 % celic, kar pomeni, da se v prst sprosti ogromno število najrazličnejših organskih molekul kot so DNK, aminokislina, lipidi ipd., ki nato služijo mikroorganizmom kot hrana. Tako se organske ogljikove spojine pretvarjajo v huminske kisline.

Pri bakterijski aktivnosti smo poleg tehnike s fluorescein diacetatom (FDA) preizkusili še tehnike z redukcijo resazurina in dehidrogenazno aktivnost, vendar smo ugotovili, da so bili pri reakciji s FDA rezultati bolj pregledni in natančnejši. Prišlo smo do spoznanj, ki so nas malce presenetila. Iz grafa lahko lepo razberemo, da pri vzorcih z dodano DNK opazimo večinoma vseskozi povišano aktivnost glede na vzorce, kjer DNK nismo dodali. Poleg tega smo vzporedno spremljali še temperaturni vpliv. Bakterijska aktivnost je bila pri vzorcih tal, ki smo jih zamrzovali in odtaljevali (COZ) višja kot pri seriji na 4 °C. Iz



tega lahko sklepamo, da so bakterije izredno dobro prilagojene na ekstremne razmere in da takšne temperaturne razlike kot smo jih imeli v našem poskusu vplivajo na njihovo aktivnost v manjši meri. Iz grafa je tudi razvidno, da je bila vsebnost encimov v tleh povišana približno peti dan inkubacije, ko so vrednosti hidroliziranega fluorescein diacetata dosegle najvišje vrednosti. Morda bi lahko povišano aktivnost pri COZ vzorcih pojasnili s tem, da so pri ciklanju preko zmrzišča celice precej popokale in so se v okolje izločile za bakterije hranilne snovi, ki so jih seveda s pridom izkoristile za energijo. Poleg tega so bile bakterije pri temperaturah pod 0 °C izpostavljene temperaturnemu šoku in so bile v toplejšem obdobju, ko so se temperature dvignile nad 0 °C, toliko bolj aktivne, da bi prišle do veliko hrane oz. energije. Iz grafa (Slika 16A) je torej razvidno, da lahko prosta DNK mikroorganizmom predstavlja vir hrane ter da je vseskozi v mikrobom dostopni obliki ne glede na način inkubacije.

Pri analizi podatkov pa ne moremo spregledati dejstva, da s tehniko T-RFLP ne vidimo sprememb v strukturi mikrobne združbe. Vemo da pri zamrzovanju približno polovica bakterijskih celic lizira in da se v tla sprosti velika količina DNK in drugih snovi, prav tako se poviša MM DOC, poleg tega pa še zasledimo povišano bakterijsko aktivnost. Kljub temu, da lahko v najslabšem primeru dodana DNK predstavlja približno 64 % celokupne količine DNK nam T-RFLP ne pokaže nobenih sprememb, niti v času 0. Čeprav smo opazili veliko sprememb v vzorcu, ostaja slika strukture mikrobne združbe, merjene s tehniko T-RFLP v času nespremenjena. Prav tako ne vidimo sprememb med serijama vzorcev COZ in 4 °C. Naš poskus lahko ima velike posledice na razumevanje spremembe struktur mikrobnih združb merjenih s tehniko T-RFLP ali merjenih z drugimi molekularnimi metodami. Upamo si trditi, da so lahko sklepi mnogih avtorjev o stabilnosti v strukturi mikrobnih združb, merjenim s tehniko T-RFLP, podvrženih različnim okoljskim spremembam popolnoma napačni.

Vendar pa lahko naši rezultati generalno kažejo sliko tudi glede sprememb združb v drugih sistemih in niso direktno vezani na hladna tla in prehajanje preko zmrzišča. Lahko so analogni spremembam v strukturi bakterijske združbe pri rasti rastlin, spremembam v prebavnem traktu, pravzaprav povsod, kjer se deli populacij spreminjajo.

Poleg DNK, katero smo izolirali direktno iz zemlje, smo na dendrogramu primerjali tudi DNK bakterij, ki smo jih namnožili v LB gojišču tekom poskusa, ko smo potrebovali precej dednega materiala za dodajanje v vzorce. Vidimo precejšnjo razliko v podobnosti s DNK izoliranim direktno iz zemlje. To se nam zdi popolnoma logično, saj vemo, da je v zemlji zelo majhen odstotek bakterij, ki jih znamo gojiti, poleg tega pa smo imeli še eno izmed osnovnih gojišč. Poleg DNK iz gojenih bakterij smo v dendrogramu primerjali tudi mešanico DNK izoliranega iz gojenih bakterij in DNK izoliranega direktno iz zemlje. Mešali smo v razmerju 1:1 in ugotovili, da je ta vzorec v dendrogramu ravno nekje na sredini med DNK iz zemlje in DNK iz gojenih bakterij, kar se nam zdi tudi povsem logično. Vsi ti podatki nam dajo vedeti, da je bila naša tehnika dovolj dobra za ugotavljanje razlik in primerljiva med vzorci, poleg tega pa lahko trdimo, da smo v poskusu zajeli celotno zemeljsko bakterijsko populacijo.

## 7 VIRI

- Aardema B.W., Lorenz M.G. in Krumbein W.E., 1983. Protection of sediment adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 417-420.
- Adam G., Duncan H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 33: 943-951.
- Alexander M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 480 str.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59: 143- 169.
- Andreoni V., Cavalca L., Rao M.A., Nocerino G., Bernasconi S., Dell'Amico E., Colombo M., Gianfreda L. 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, 57: 401–412.
- Applied Maths. 2010. BioNumerics. Austin, Applied Maths: 1 str. <http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm> (januar 2010).
- ARSO. 2002. Meteorološki letopis 2002- mesečne temperature tal. Ljubljana, Agencija Republike Slovenije za Okolje: 11-13. [http://www.arso.gov.si/vreme/podnebje/tem\\_tla.pdf](http://www.arso.gov.si/vreme/podnebje/tem_tla.pdf) (19. september 2010).
- Atlas R.M., Bartha R. 1993. *Microbial ecology: Fundamentals and application*. 4<sup>th</sup> ed. Redwood City, Benjamin/Cummings Publishing co.: 694 str.
- Ausubel I., Frederic M. 1987. *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.: 1600 str.
- Backert S., Meyer T.F. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current Opinions in Microbiology*, 9: 207–217.
- Baker R.T. 1977. Humic acid-associated organic phosphate. *New Zealand Journal of Science*, 20: 439–441.

- Bakken L. R., Frostegard A. 2006. Nucleic acid extraction from soil. *Soil Biology-Nucleic Acids and Proteins in Soil*, 8: 49- 73.
- Bakken R.L., Olsen R.A. 1989. DNA- content of soil bacteria of different cell size. *Soil Biology and Biochemistry*, 21, 6: 789-793.
- Barcenas-Moreno G., Gomez-Brandon M., Rousk J., Baath E. 2009. Adaptation of soil microbial communities to temperature: Comparison of fungi and bacteria in a laboratory study. *Global Change Biology*, 15: 2950–2957.
- Blum S.A.E., Lorenz M.G., Wackernagel W. 1997. Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of Dnases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 513–521.
- Bowman R.A., Cole C.V. 1978. Transformations of organic phosphorus substrates in soils as evaluated by NaHCO<sub>3</sub> extraction. *Soil Science*, 125: 49–54.
- Bragazza L., Freeman C., Jones T., Rydin H., Limpens J., Fenner N., Ellis T., Gerdol R., Hájek M., Hájek T., Iacumin P., Kutnar L., Tahvanainen T., Tobermanc H. 2006. Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 51: 19386–19389.
- Ceccherini M., Pote J., Kay E., Van V.T., Marechal J., Pietramellara G., Nannipieri P., Vogel T.M., Simonet P. 2003. Degradation and transformability of DNA from transgenic leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 673–678.
- Christensen H., Bakken L.R., Olsen R.A. 1995. Flow cytometric measurements of cell volumes and DNA contents during culture of indigenous soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 49-62.
- Christensen H., Bakken L.R., Olsen R.A. 1993. Soil bacterial DNA and biovolume profiles measured by flow-cytometry. *FEMS Microbiology Ecology*, 102: 129-140.
- Courtois S., Frostegard A., Goransson P., Depret G., Jeannin P., Simone1 P. 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: Comparison of DNA extracted directly from soil or from cells previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*, 3: 431-439.

- Crecchio C., Stotzky G. 1998. Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to Dnase. *Soil Biology & Biochemistry*, 30: 1060–1067.
- de Vries J., Heine M., Harms K., Wackernagel W. 2003. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4455–4462.
- de Vries J., Meier P., Wackernagel W. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter sp.* By transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiology Letters*, 195: 211–215.
- de Vries J., Wackernagel W. 2004. Microbial horizontal gene transfer and the DNA release from transgenic crop plants. *Plant and Soil*, 266: 91–104.
- Demaneche S., Jocteur-Monrozier L., Quiquampoix H., Simonet P. 2001. Evaluation of biological and physical protection against nuclease degradation of clay-bound plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 293–299.
- Diaz-Ravina M., Frostegard A., Baath E. 1994. Thymidine, leucine and acetate incorporation into soil bacterial assemblages at different temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, 14: 221–232.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*, London, Academic Press: 1264 str.
- Dubnau D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 53: 217–244.
- Elliot A.C., Henry H.A.L. 2009. Freeze–thaw cycle amplitude and freezing rate effects on extractable nitrogen in a temperate old field soil. *Biology and Fertility Soils*, 45: 469–476.
- England L.S., Lee H., Trevors J.T. 1995. Recombinant and wildtype *Pseudomonas aureofaciens* strains introduced to soil: Effect on cellulose and straw decomposition. *Molecular Ecology*, 4: 221–230.
- England L.S., Lee H., Trevors J.T. 1997. Persistence of *Pseudomonas aureofaciens* strains and DNA in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 1521–1527.

- Feng X., Nielsena L. L., Simpson M. J. 2007. Responses of soil organic matter and microorganisms to freeze–thaw cycles. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 2027–2037.
- Finkel S.E., Kolter R. 2001. DNA as a nutrient: Novel roll for bacterial competence gene homologs. *Journal of Bacteriology*, 183: 6288–6293.
- Frostegard A., Courtois S., Ramišse V., Clerc S., Bernillon D., Le Gall F., Jeannin P., Nesme X., Simonet P. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 12: 5409- 5420.
- Gebhard F., Smalla K. 1998. Transformation of *Acinetobacter sp.* Strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1550–1554.
- Gebhard F., Smalla K. 1999. Monitoring field releases of transgenic modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbial Ecology*, 28: 261–272.
- Google maps. 2010. Ljubljana. Amphitheatre Parkway Mountain, Google inc.: 1 str.  
<http://maps.google.com/> (10. september 2010).
- Greaves M.P., Wilson M.J. 1969. The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biology & Biochemistry*, 1: 317–323.
- Greaves M.P., Wilson M.J. 1970. The degradation of nucleic acids and montmorillonite–nucleic-acid complexes by soil microorganisms. *Soil Biology & Biochemistry*, 2: 257–268.
- Greenwood A.D., Capelli C., Possnert G., Paabo S. 1999. Nuclear DNA sequences from late Pleistocene megafauna. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1466–1473.
- Grüntzig V., Stres B., Ayala del Río H.L., Tiedje J.M. 2006. Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis. *Acta Agriculturae Slovenica*, 88, 2: 65-73.
- Gulden R.H., Lerat S., Hart M.M., Powell J.T., Trevors J.T., Pauls K.P., Klironomos J.N., Swanton C.J. 2005. Quantitation of transgenic plant DNA in

- leachate water: Real-time polymerase chain reaction analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5858–5865.
- Hamilton H.L., Dominguez N.M., Schwartz K.J., Hackett K.T., Dillard J.P. 2005. *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology*, 55: 1704–1721.
- Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4,1: 9 str.  
[http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf)
- Hartley I.P., Hopkins D.W., Garnett M.H., Sommerkorn M., Wookey P.A. 2008. Soil microbial respiration in arctic soils does not acclimate to temperatures. *Ecology Letters*, 11: 1092–1100.
- Hattori T., Hattori R. 1973. *Microbial life in the soil: an introduction*. New York, Marcel Dekker: 427 str.
- Hawes M.C. 1990. Living plant cells released from the root cap: a regulator of microbial populations in the rhizosphere? *Plant and Soil*, 129: 19–27.
- Henderson J.F., Paterson A.R.P. 1973. *Nucleotide metabolism: An introduction*. London, Academic Press: 304 str.
- Henriksen T.M., Breland T.A. 1999. Decomposition of crop residues in the field: evaluation of a simulation model developed from microcosm studies. *Soil Biology & Biochemistry*, 31: 1423–1434.
- Henry H.A.L. 2007. Soil freeze–thaw cycle experiments: trends, methodological weaknesses and suggested improvements. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 977–986.
- Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 8: 5181–5189.
- Hesselink F. T. 1983. Adsorption of polyelectrolytes from dilute solution. V: Adsorption from solution at the solid/liquid interface. Parfitt G.D., Rochester C.H. (eds.). London, Academic Press, Inc.: 377-412.

- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N. Kuch M., Paabo S. 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2: 353–360.
- Ileršič T. 2007. Naravne danosti za postavitev vodnih ekoremediacijskih sistemov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 40 str.
- Jerman V., Metje M., Mandič Mulec I., Frenzel P. 2009. Wetland restoration and methanogenesis: The activity of microbial populations and competition for substrates at different temperatures. *Biogeosciences Discuss*, 6: 1127–1138.
- Kay E., Vogel T.M., Bertolla F., Nalin R., Simonet P. 2002. *In situ* transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3345–3351.
- Khanna M., Stotzky G. 1992. Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of Dnase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1930–1939.
- Kornberg A. 1974. DNA synthesis. San Francisco, W.H. Freeman and Company: 399 str.
- Lenarčič R. 2006. Bioremediacijski potencial šotnih tal. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 53 str.
- Lerat S., England L.S., Vincent M.L., Pauls K.P., Swanton C.J., Klironomos J.N., Trevors J.T. 2005. Real-time polymerase chain reaction (PCR) quantification of the transgenes for Roundup Ready corn and Roundup Ready soybean in soil samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1337–1342.
- Levy-Booth D. J., Campbell R.G. Gulden R. H., Hart M. M., Powell J. R., Klironomos J. N., Pauls K. P., Swanton C. J., Trevors J. T., Dunfield K. E. 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology & Biochemistry*, 39: 2977–2991.
- Likar M., Regvar M., Mandic-Mulec I., Stres B., Bothe H. 2009. Diversity and seasonal variations of mycorrhiza and rhizosphere bacteria in three common plant species at the Slovenia Ljubljana Marsh. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 6: 573- 583.



- Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H., Forney L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4516-4522.
- Lobnik A. 2009. Navodila za vaje pri predmetu Analizna kemija- okoljska analitika. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo: 18 str.
- Lorenz M.G., Gerjets D., Wackernagel W. 1991. Release of transforming plasmid and chromosomal DNA from two cultured soil bacteria. *Archives of Microbiology*, 156: 319–326.
- Lorenz M.G., Wackernagel W. 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2948–2952.
- Lorenz M.G., Wackernagel W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58: 563–602.
- Macfadyen L.P., Chen D., Vo H.C., Liao D., Sinotte R., Redfield R.J. 2001. Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Molecular Microbiology*, 40: 700–707.
- Madigan M., Martinko J. 2006. Brock biology of microorganisms, 11<sup>th</sup> ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River: 991 str.
- Nedwell D.B. 1999. Effects of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperatures. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 101–111.
- Norghauer J. M., Malcolm J. R., Zimmerman B. L., Felfili J. M. 2008. Experimental establishment of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King) seedlings on two soil types in native forest of Para', Brazil. *Forest Ecology and Management*, 255: 282–291.
- Odar T. 2011. Aktivnost in struktura bakterijskih mikrobnih združb v ledeniških sedimentih (Spitzbergen, Svalbard, Norveška) v odvisnosti od okoljskih dejavnikov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 55 str.

- Paget E., Monrozier L. J., Simonet P. 1992. Adsorption of DNA on clay minerals: protection against Dnase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, 97: 31–40.
- Polverari A., Buonauro R., Guiderdone S., Pezatti M., Marte M. 2000. Ultrastructural observations and DNA degradation analysis of pepper leaves undergoing a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 423–431.
- Recorbet G., Picard C., Normand P., Simonet P. 1993. Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetically engineered *Escherichia coli* introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 4289–4294.
- Redfield R.J. 1988. Evolution of bacterial transformation: is sex with dead cells ever better than no sex at all? *Genetics*, 116: 213–221.
- Redfield R.J. 1993. Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it too of bacterial transformation. *Journal of Heredity*, 84: 400–404.
- Roche Applied Science. 2009. Nucleic acid isolation and purification manual. Mannheim, Roche Applied Science: 244 str.
- Rodrigues D.F., Tiedje J.M. 2008. Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1677–1686.
- Romanowski G., Lorenz M.G., Wackernagel W. 1991. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against Dnase I. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1057–1061.
- Schmitt A., Glaser B., Borken W., Matzner E. 2008. Repeated freeze–thaw cycles changed organic matter quality in a temperate forest soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 171: 707–718.
- Sigma Aldrich Catalog. 2010. Fluorescein diacetate. Taufkirchen, Sigma Aldrich Catalog: 1 str.  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F7378|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPECi](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=F7378|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPECi)  
(20.september 2010)
- Snow A.A., Andow D.A., Gepts P., Hallerman E.M., Power A., Tiedje J.M., Wolfenbarger L.L. 2005. Genetically engineered organisms and the

- environment: current status and recommendations. *Ecological Applications*, 15: 377–404.
- Soulides D.A., Allison F.E. 1961. Effect of drying and freezing soils on carbon dioxide production, available mineral nutrients, aggregation, and bacterial population. *Soil Science*, 91: 291–298.
- Steinmoen H., Knutsen E., Havarstein L.S. 2002. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 99: 7681–7686.
- Stres B., Danevcic T., Pal L., Luka M.M., Resman L., Leskovec S., Hacin J., Mandic-Mulec I. 2008. Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 66: 110–122.
- Stres B., Philippot L., Faganeli J., Tiedje J.M. 2010. Frequent freeze-thaw cycles yield diminished yet resistant and responsive microbial communities in two temperate soils: a laboratory experiment. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 323–335.
- Stres B., Tiedje J. M., 2006. New frontiers in soil microbiology: How to link structure and function of microbial communities? *Soil Biology- Nucleic Acids and Proteins in Soil*, 8: 1-22.
- Stres B., Tiedje J.M., Murovec B. 2009. BEsTRF: a tool for optimal resolution of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis based on user-defined primer-enzyme-sequence databases. *Bioinformatics Applications*, 25, 12: 1556–1558.
- Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P., Zuberer D.A. 1999. Principles and applications of soil microbiology. New Jersey, Upper Saddle River. Pearson Prentice Hall: 550 str.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.

- Tian G., Brussaard L., Kang B.T. 1995. An index for assessing the quality of plant residues and evaluating their effects on soil and crop in the (sub-) humid tropics. *Applied Soil Ecology*, 2: 25-32.
- Trainor. R.F. 1978. *Introductory phycology*. New York, John Wiley & sons: 525 str.
- Tscherko D., Rustemeier J., Richter A., Wanek W., Kandeler E. 2003. Functional diversity of the soilmicroflora in primary succession across two glacier forelands in the Central Alps. *European Journal of Soil Science*, 54: 685–696.
- Turner B.L., Baxter R., Mahieu N., Sjögersten S., Whitton B.A. 2004. Phosphorus compounds in subarctic Fennoscandian soils at the mountain birch (*Betula pubescens*)—tundra ecotone. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 815–823.
- Turner B.L., Newman S. 2005. Phosphorus cycling in wetland soils: the importance of phosphate diesters. *Journal of Environmental Quality*, 34: 1921–1929.
- Uribelarrea M., Carcova J., Otegui M.E., Westgate M.E. 2002. Pollen production, pollination dynamics, and kernel set in maize. *Crop Science*, 42: 1910–1918.
- Verstraete W., Mertens B. 2004. Vital soil: Function, value and properties. *Developments in Soil Science*, 29: 127-157.
- Walker V.K., Palmer G.R., Voordouw G. 2006. Freeze–thaw tolerance and clues to the winter survival of a soil community. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 1784–1792.
- Weigand K., Auerswald K., Beck T. 1995. Microbial biomass in agricultural topsoils after 6 years of bare fallow. *Biology and Fertility of Soils*, 19: 129-134.
- Widmer F., Seidler R.J., Watrud L.S. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology*, 5: 603–613.
- Willerslev E., Hansen A.J., Ronn R., Brand T.B., Barnes I., Wiuf C., Gilichinsky D.A., Mitchell D., Cooper A. 2004. Long-term persistence of bacterial DNA. *Current Biology*, 14: R9–R10.
- Zajec N. 2004. Vpliv okoljskih dejavnikov na aktivnost in pestrost mikrobne združbe v barjanskih tleh. Ljubljana, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 47 str.

Ziibisch M.A., Richter C., Heiligttag B., Schlott R. 1995. Nutrient losses from cropland in the Central Highlands of Kenya due to surface runoff and soil. *Soil and Tillage Research*, 33: 109- 116.

Zupan M., Grčman H., Kočevar H. 1998. Navodila za vaje iz pedologije za študente agronomije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 47 str.

## ZAHVALA

- Hvala mentorju, doc. dr. Blažu Stresu, ki mi je bil zmeraj pripravljen pomagati, svetovati, vzpodbujati, odgovarjati na vprašanja in me voditi skozi diplomsko nalogo.
- Hvala doc. dr. Tomažu Accettu za kritičen pregled naloge in vse konstruktivne pripombe.
- Hvala dr. Andreju Razpetu za pomoč pri izvedbi kapilarne elektroforeze.
- Hvala vsem na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo za pomoč, koristne nasvete in nasmejana jutra. Super ekipa ste!
- Hvala tudi množici super prijateljev, ki so me tekom študija vzpodbujali in me znali tudi sprostiti, hvala pa tudi tistim, ki so me znali posredno pripraviti do študija.
- Čeprav zadnje ampak najbolj pomembno- ati, mami, Anže, hvala za vse, da mi je uspelo doseči univerzitetno izobrazbo. Mami, tukaj pa res ni šlo po liniji najmanjšega odpora, ampak uspelo mi je!

## PRILOGE

### Priloga A: Fizikalno-kemijske lastnosti različnih tal

simbol	vzorec	fizikalno- kemijske lastnosti tal						vir	skupina tal
		pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg		
a1	Slovenija – polje1	6,9	24	53	23	2,5	0,3	Stres in sod., 2010	CE
a2	Slovenija – polje2	6,3	24,6	52,4	23	2,6	0,26	Lenarčič, 2006	CE
a3	<b>Slovenija – polje3</b>	<b>7,4</b>	<b>14,8</b>	<b>31,2</b>	<b>54</b>	<b>2,6</b>		<b>ta študija</b>	<b>CE</b>
a4	Slovenija – barje1	6,6	60,3	39,3	0,1	15	1,3	Lenarčič, 2006	CE
a5	Slovenija – barje2	6	6	16,3	77,7	15	1,3	Henry in sod., 2006	CE
a6	Slovenija – barje3	7,3	55,6	32	13	15	1,2	Stres in sod., 2010	CE
a7	Slovenija – barje4	7,6	60,3	39,6	0,1	16	1,3	Jerman in sod., 2009	CE
a8	Nemčija	6,7	25	15	60	11,1	0,4	Andreoni in sod., 2004	CE
a9	Italija	7,7	23	24	53	7,7	2,2	Andreoni in sod., 2004	CE
a10	Belgija	8,2	7	8	85	8,2	0,7	Andreoni in sod., 2004	CE
a11	Francija	5,89	14,3	66,6	19,3	0,94	0,1	Henry in sod., 2006	CE
a12	Francija	5,8	33,3	51,3	15,4	1,53	0,17	Henry in sod., 2006	CE
a13	Nemčija 1	4,5	8	12	81	0,62		Weigand in sod., 1995	CE
a14	Nemčija 2	5	11	31	58	0,61		Weigand in sod., 1995	CE
a15	Nemčija 3	6	6	8	86	0,55		Weigand in sod., 1995	CE
a16	Nemčija 4	5,6	10	21	69	0,79		Weigand in sod., 1995	CE
a17	Nemčija 5	7,4	31	45	24	0,67		Weigand in sod., 1995	CE
a18	Nemčija 6	5,7	8	10	82	1,61		Weigand in sod., 1995	CE

se nadaljuje...

nadaljevanje priloge A: Fizikalno-kemijske lastnosti različnih tal

simbol	vzorec	fizikalno- kemijske lastnosti tal						vir	skupina tal
		pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg		
a19	Nemčija 7	5,1	5	9	86	1,59		Weigand in sod., 1995	CE
a20	Nemčija 8	7	20	78	2	0,78		Weigand in sod., 1995	CE
a21	Nemčija 9	5	16	33	51	1,50		Weigand in sod., 1995	CE
a22	Nemčija 10	6,6	21	36	43	0,95		Weigand in sod., 1995	CE
a23	Nemčija 11	7,1	12	27	61	0,84		Weigand in sod., 1995	CE
a24	Nemčija 12	6,3	15	37	48	1,00		Weigand in sod., 1995	CE
a25	Nemčija 13	5,8	22	40	38	1,16		Weigand in sod., 1995	CE
a26	Nemčija 14	6,5	17	79	4	0,94		Weigand in sod., 1995	CE
a27	Nemčija 15	6	24	33	43	0,89		Weigand in sod., 1995	CE
a28	Nemčija 16	7,4	38	50	12	1,04		Weigand in sod., 1995	CE
a29	Nemčija 17	6,6	16	29	55	1,76		Weigand in sod., 1995	CE
a30	Nemčija 18	5,6	22	64	14	1,11		Weigand in sod., 1995	CE
a31	Nemčija 19	5,1	25	49	25	1,64		Weigand in sod., 1995	CE
a32	Nemčija 20	5,6	37	52	12	1,82		Weigand in sod., 1995	CE
a33	Nemčija 21	6,6	34	64	2	0,84		Weigand in sod., 1995	CE
a34	Nemčija 22	6,3	25	49	25	1,26		Weigand in sod., 1995	CE
a35	Nemčija 23	7,4	25	62	13	0,88		Weigand in sod., 1995	CE
a36	Nemčija 24	5,7	23	60	18	1,54		Weigand in sod., 1995	CE
a37	Nemčija 25	6,8	21	58	22	1,37		Weigand in sod., 1995	CE
a38	Nemčija 26	6,9	22	16	63	1,44		Weigand in sod., 1995	CE
a39	Nemčija 27	7,4	63	33	4	1,43		Weigand in sod., 1995	CE

se nadaljuje...



nadaljevanje priloge A: Fizikalno-kemijske lastnosti različnih tal

fizikalno- kemijske lastnosti tal									
simbol	vzorec	pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg	vir	skupina tal
a40	Nemčija 28	7,5	24	67	9	0,98		Weigand in sod., 1995	CE
a41	Nemčija 29	7,3	36	19	45	1,48		Weigand in sod., 1995	CE
a42	Nemčija 30	6,9	45	38	17	1,90		Weigand in sod., 1995	CE
a43	Nemčija 31	7	36	43	21	2,90		Weigand in sod., 1995	CE
a44	Nemčija 32	7,1	31	39	30	2,93		Weigand in sod., 1995	CE
a45	Himalaja 6000m	5,4	6,9	20,1	72,2	1,5	0,1	Stres in sod., 2010	hladna
a46	Himalaja 5800m	5,6	1,6	19,8	78,6	0,6	0	Stres in sod., 2010	hladna
a47	Himalaja 5600m	5,9	1,9	20,6	77,4	2,0	0,1	Stres in sod., 2010	hladna
a48	Himalaja 5400m	5,9	1,6	27,2	71,2	1,9	0,2	Stres in sod., 2010	hladna
a49	Himalaja 5200m	5,1	6,9	28	65	2,1	0,1	Stres in sod., 2010	hladna
a50	Himalaja 5000m	6,4	2,7	25,1	72,2	0,5	0	Stres in sod., 2010	hladna
a51	Odenwinkel 1994	6,4	1	13	85	0,9	0,1	Tscherko in sod., 2003	hladna
a52	Odenwinkel 1980	6,34	1	13	85	0,9	0,17	Tscherko in sod., 2003	hladna
a53	Odenwinkel 1970	5,46	1	13	85	1,9	0,18	Tscherko in sod., 2003	hladna
a54	Odenwinkel 1950	5,57	1	13	85	2,7	0,2	Tscherko in sod., 2003	hladna
a55	Odenwinkel 1900	5,23	1	13	85	4,1	0,25	Tscherko in sod., 2003	hladna
a56	Odenwinkel 1850	4,08	1	13	85	6,0	0,44	Tscherko in sod., 2003	hladna
a57	Odenwinkel ref. Site	3,64	1	13	85	7,2	0,51	Tscherko in sod., 2003	hladna
a58	Rootmos 1980	7,5	1	23	76	1,2	0,31	Tscherko in sod., 2003	hladna
a59	Rootmos 1970	7,58	1	23	76	0,5	0,13	Tscherko in sod., 2003	hladna
a60	Rootmos 1950	7,28	1	23	76	3,6	0,52	Tscherko in sod., 2003	hladna

se nadaljuje...

nadaljevanje priloge A: Fizikalno-kemijske lastnosti različnih tal

		fizikalno- kemijske lastnosti tal							
simbol	vzorec	pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg	vir	skupina tal
a61	Rootmos 1920	6,34	1	23	76	5,409	0,53	Tscherko in sod., 2003	hladna
a62	Rootmos 1850	7,07	1	23	76	12,2	0,63	Tscherko in sod., 2003	hladna
a63	Rootmos ref. Site	5,05	1	23	76	19,3	1,92	Tscherko in sod., 2003	hladna
a64	Svalbard 1	5,71	5,77	6,9	87,33	1,49	0,03	Odar, 2011	hladna
a65	Svalbard 2	4,9	9,8	5,4	84,8	0,60	0,02	Odar, 2011	hladna
a66	Svalbard 3	4,9	11,3	5,1	83,6	0,30	0,01	Odar, 2011	hladna
a67	Svalbard 4	5,77	29	21,57	49,47	0,27	0	Odar, 2011	hladna
a68	Svalbard 5	6,43	9,8	18,13	72,02	0,04	0	Odar, 2011	hladna
a69	Svalbard 6	6,68	12,5	12,57	74,93	0,03	0	Odar, 2011	hladna
a70	Brazilija	4,8	40	32	28	17,3	1,9	Norghauer in sod., 2008	ekvatorialna
a71	Kenija	6,5	25,3	16,8	57,9	0,2	2	Ziibisch in sod., 1995	ekvatorialna

\*CE- Centralno- evropska tla

Priloga B: Preglednica različno tretiranih vzorcev uporabljenih v raziskavi

ime vzorca	COZ (1) ali 4°C (0)	z DNK (0); brez DNK (1)	čas inkubacije (dan)	št. Ponovitve	gojena iz biomase	direktna izolacija	kombinacija gojene in direktne DNK
4°C t=0r1	0	0	0	1		da	
4°C t=0r1 brez	0	1	0	1		da	
4°C t=0r2	0	0	0	2		da	
4°C t=0r2 brez	0	1	0	2		da	
4°C t=0r3	0	0	0	3		da	
4°C t=0r3 brez	0	1	0	3		da	
4°C t=1r1	0	0	1	1		da	
4°C t=1r1 brez	0	1	1	1		da	
4°C t=1r2	0	0	1	2		da	
4°C t=1r2 brez	0	1	1	2		da	
4°C t=1r3	0	0	1	3		da	
4°C t=1r3 brez	0	1	1	3		da	
4°C t=3r1	0	0	3	1		da	
4°C t=3r1 brez	0	1	3	1		da	
4°C t=3r2	0	0	3	2		da	
4°C t=3r2 brez	0	1	3	2		da	
4°C t=3r3	0	0	3	3		da	
4°C t=3r3 brez	0	1	3	3		da	
4°C t=6r1	0	0	6	1		da	
4°C t=6r1 brez	0	1	6	1		da	
4°C t=6r2	0	0	6	2		da	
4°C t=6r2 brez	0	1	6	2		da	
4°C t=6r3	0	0	6	3		da	
4°C t=6r3 brez	0	1	6	3		da	
4°C t=10r1	0	0	10	1		da	
4°C t=10r1 brez	0	1	10	1		da	
4°C t=10r2	0	0	10	2		da	
4°C t=10r2 brez	0	1	10	2		da	
4°C t=10r3	0	0	10	3		da	
4°C t=10r3 brez	0	1	10	3		da	
4°C t=13r1	0	0	13	1		da	
4°C t=13r1 brez	0	1	13	1		da	
4°C t=13r2	0	0	13	2		da	
4°C t=13r2 brez	0	1	13	2		da	
4°C t=13r3	0	0	13	3		da	
4°C t=13r3 brez	0	1	13	3		da	
4°C t=17r1	0	0	17	1		da	

se nadaljuje...

nadaljevanje priloge B: Preglednica različno tretiranih vzorcev uporabljenih v raziskavi

ime vzorca	COZ (1) ali 4°C (0)	z DNK (0); brez DNK (1)	čas inkubacije (dan)	št. Ponovitve	gojena iz biomase	direktna izolacija	kombinacija gojene in direktno DNK
4°C t=17r1 brez	0	1	17	1		da	
4°C t=17r2	0	0	17	2		da	
4°C t=17r2 brez	0	1	17	2		da	
4°C t=17r3	0	0	17	3		da	
4°C t=17r3 brez	0	1	17	3		da	
ftc t=1r1	1	0	1	1		da	
ftc t=1r1 brez	1	1	1	1		da	
ftc t=1r2	1	0	1	2		da	
ftc t=1r2 brez	1	1	1	2		da	
ftc t=1r3	1	0	1	3		da	
ftc t=1r3 brez	1	1	1	3		da	
ftc t=3r1	1	0	3	1		da	
ftc t=3r1 brez	1	1	3	1		da	
ftc t=3r2	1	0	3	2		da	
ftc t=3r2 brez	1	1	3	2		da	
ftc t=3r3	1	0	3	3		da	
ftc t=3r3 brez	1	1	3	3		da	
ftc t=6r1	1	0	6	1		da	
ftc t=6r1 brez	1	1	6	1		da	
ftc t=6r2	1	0	6	2		da	
ftc t=6r2 brez	1	1	6	2		da	
ftc t=6r3	1	0	6	3		da	
ftc t=6r3 brez	1	1	6	3		da	
ftc t=10r1	1	0	10	1		da	
ftc t=10r1 brez	1	1	10	1		da	
ftc t=10r2	1	0	10	2		da	
ftc t=10r2 brez	1	1	10	2		da	
ftc t=10r3	1	0	10	3		da	
ftc t=10r3 brez	1	1	10	3		da	
ftc t=13r1	1	0	13	1		da	
ftc t=13r1 brez	1	1	13	1		da	
ftc t=13r2	1	0	13	2		da	
ftc t=13r2 brez	1	1	13	2		da	
ftc t=13r3	1	0	13	3		da	
ftc t=13r3 brez	1	1	13	3		da	
ftc t=17r1	1	0	17	1		da	
ftc t=17r1 brez	1	1	17	1		da	
ftc t=17r2	1	0	17	2		da	
ftc t=17r2 brez	1	1	17	2		da	
ftc t=17r3	1	0	17	3		da	
ftc t=17r3 brez	1	1	17	3		da	

se nadaljuje...

nadaljevanje priloge B: Preglednica različno tretiranih vzorcev uporabljenih v raziskavi

ime vzorca	COZ (1) ali 4°C (0)	z DNK (0); brez DNK (1)	čas inkubacije (dan)	št. Ponovitve	gojena iz biomase	direktna izolacija	kombinacija gojene in direktne DNK
DNA1gojena				1	da		
DNA2gojena				2	da		
DNA3gojena				3	da		
DNA4gojena				4	da		
DNA5gojena				5	da		
DNA6gojena				6	da		
DNA7gojena				7	da		
ime vzorca			čas inkubacije (dan)	št. Ponovitve	gojena iz biomase	direktna izolacija	kombinacija gojene in direktne DNK
4°C t=10r2 brez+ DNA2gojena				1			da
4°C t=0r2 brez + DNA2 gojena				2			da
4°C t=0r3 brez + DNA3gojena				3			da
4°C t=0r1 brez+ DNA1gojena				4			da
4°C t=10r1 brez+ DNA3gojena				5			da
4°C t=10r3 brez+ DNA3gojena				6			da
4°C t=10r1 brez+ DNA1gojena				7			da

Opomba: Vzorce COZ smo na začetku označevali z njihovo anglesško kratico FTC

Priloga C: Rezultati merjenja aktivnosti mikrobnih združb s FDA za vzorce inkubirane po COZ in izračun koncentracije fluoresceina.

<b>COZ</b>			
<b>z DNK</b>			
dan	A	A-slepa	c fluoresceina
0	0,238	0,248	1,636
	0,187	0,197	1,357
	0,147	0,157	1,138
1	0,487	0,331	2,089
	0,516	0,360	2,248
	0,686	0,530	3,177
3	0,761	0,831	4,821
	0,688	0,758	4,422
	0,604	0,674	3,963
5	0,811	0,811	4,715
	0,723	0,723	4,234
	0,930	0,930	5,365
8	0,443	-0,149	-0,528
	0,522	-0,069	-0,097
	0,548	-0,043	0,045
10	0,603	0,162	1,166
	0,587	0,146	1,078
	0,553	0,112	0,892
13	0,471	0,471	2,857
	0,477	0,477	2,890
	0,480	0,480	2,906
17	0,758	0,753	4,398
	0,833	0,828	4,808
	0,640	0,635	3,753

<b>brez DNK</b>		
A	A-slepa	c fluoresceina
0,233	0,237	1,578
0,192	0,196	1,354
0,173	0,177	1,250
0,408	0,400	2,469
0,379	0,371	2,310
0,362	0,354	2,217
0,428	-0,048	0,021
0,404	-0,072	-0,110
0,465	-0,011	0,223
0,423	0,423	2,595
0,476	0,476	2,884
0,431	0,431	2,638
0,475	-0,079	-0,149
0,476	-0,078	-0,143
0,418	-0,136	-0,460
0,529	0,185	1,294
0,486	0,142	1,059
0,470	0,126	0,972
0,254	0,254	1,671
0,303	0,303	1,939
0,292	0,292	1,879
0,547	0,547	3,272
0,460	0,460	2,797
0,462	0,462	2,808

Priloga D: Rezultati merjenja aktivnosti mikrobnih združb s FDA za vzorce inkubirane pri 4 °C in izračun koncentracije fluoresceina.

<b>4°C</b>				<b>brez DNK</b>			
<b>z DNK</b>							
dan	A	A-slepa	c fluoresceina	A	A-slepa	c fluoresceina	
0	0,238	0,248	1,636	0,233	0,237	1,578	
	0,187	0,197	1,357	0,192	0,196	1,354	
	0,147	0,157	1,138	0,173	0,177	1,250	
1	0,469	0,479	2,898	0,41	0,414	2,545	
	0,582	0,592	3,515	0,554	0,558	3,332	
	0,522	0,532	3,187	0,41	0,414	2,545	
3	0,523	0,533	3,193	0,404	0,408	2,513	
	0,560	0,570	3,395	0,415	0,419	2,573	
	0,649	0,659	3,881	0,508	0,512	3,081	
5	0,647	0,657	3,870	0,501	0,505	3,043	
	0,772	0,782	4,554	0,506	0,51	3,070	
	0,899	0,909	5,248	0,672	0,676	3,977	
8	0,517	0,527	3,160	0,335	0,339	2,136	
	0,614	0,624	3,690	0,405	0,409	2,518	
	0,473	0,483	2,920	0,385	0,389	2,409	
10	0,432	0,442	2,696	0,344	0,348	2,185	
	0,390	0,400	2,466	0,281	0,285	1,840	
	0,455	0,465	2,821	0,387	0,391	2,420	
13	0,359	0,369	2,297	0,265	0,269	1,753	
	0,366	0,376	2,335	0,289	0,293	1,884	
	0,403	0,413	2,537	0,302	0,306	1,955	
17	0,548	0,558	3,330	0,432	0,436	2,666	
	0,612	0,622	3,679	0,563	0,567	3,381	
	0,556	0,566	3,373	0,537	0,541	3,239	

Priloga E: Rezultati merjenja velikosti delcev za vzorce inkubirane po COZ in izračun indeksa molekulske mase.

<b>COZ</b>				<b>brez DNK</b>		
<b>z DNK</b>				<b>A250</b>	<b>A365</b>	<b>COZ MWI brez</b>
<b>t (dan)</b>	<b>A250</b>	<b>A365</b>	<b>COZ MWI</b>			
<b>0</b>	0,566	0,332	0,587	0,688	0,439	0,638
	0,612	0,366	0,598	0,851	0,554	0,651
	0,635	0,386	0,608	0,622	0,386	0,621
<b>1</b>	1,659	1,020	0,615	0,810	0,502	0,620
	1,386	0,886	0,639	0,886	0,546	0,616
	1,534	0,958	0,625	0,847	0,517	0,610
<b>3</b>	0,790	0,368	0,466	0,438	0,167	0,381
	0,605	0,230	0,380	0,502	0,187	0,373
	0,536	0,206	0,384	0,412	0,154	0,374
<b>5</b>	0,571	0,211	0,370	0,414	0,161	0,389
	0,504	0,185	0,367	0,394	0,152	0,386
	0,573	0,208	0,363	0,520	0,191	0,367
<b>8</b>	0,497	0,182	0,366	0,391	0,147	0,376
	0,494	0,187	0,379	0,346	0,132	0,382
	0,477	0,178	0,373	0,400	0,150	0,375
<b>10</b>	0,458	0,163	0,356	0,406	0,147	0,362
	0,474	0,165	0,348	0,422	0,151	0,358
	0,501	0,174	0,347	0,580	0,215	0,371
<b>13</b>	0,464	0,171	0,369	0,360	0,137	0,381
	0,474	0,171	0,361	0,376	0,144	0,383
	0,507	0,186	0,367	0,381	0,152	0,399
<b>17</b>	0,510	0,178	0,349	0,480	0,175	0,365
	0,518	0,184	0,355	0,469	0,168	0,358
	0,490	0,177	0,361	0,491	0,177	0,360



Priloga F: Rezultati merjenja velikosti delcev za vzorce inkubirane pri 4 °C in izračun indeksa molekulske mase.

<b>4°C</b>				<b>brez DNK</b>		
<b>z DNK</b>				<b>A250</b>	<b>A365</b>	<b>4 °C MWI brez</b>
<b>t (dan)</b>	<b>A250</b>	<b>A365</b>	<b>4 °C MWI</b>			
<b>0</b>	0,566	0,332	0,587	0,688	0,439	0,638
	0,612	0,366	0,598	0,851	0,554	0,651
	0,635	0,386	0,608	0,622	0,386	0,621
<b>1</b>	0,624	0,375	0,601	0,611	0,375	0,614
	0,613	0,364	0,594	0,6	0,364	0,607
	0,602	0,353	0,586	0,589	0,353	0,599
<b>3</b>						
<b>5</b>	0,550	0,309	0,562	0,579	0,309	0,534
	0,537	0,295	0,549	0,563	0,298	0,529
	0,524	0,281	0,536	0,547	0,287	0,525
<b>8</b>	0,513	0,270	0,526	0,531	0,276	0,520
	0,502	0,259	0,516	0,515	0,265	0,515
	0,491	0,248	0,505	0,499	0,259	0,519
<b>10</b>						
<b>13</b>	0,427	0,210	0,492	0,446	0,204	0,457
	0,411	0,199	0,484	0,435	0,191	0,439
	0,395	0,188	0,476	0,424	0,199	0,469
<b>17</b>	0,418	0,161	0,385	0,400	0,155	0,388
	0,452	0,172	0,381	0,436	0,167	0,383
	0,441	0,168	0,381	0,439	0,170	0,387