

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina KLEMENČIČ

**FENOTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV
BAKTERIJSKIH IZOLATOV IZ MORSKIH IN
SLADKOVODNIH SEDIMENTOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nina KLEMENČIČ

**FENOTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH
IZOLATOV IZ MORSKIH IN SLADKOVODNIH SEDIMENTOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF
BACTERIAL ISOLATES FROM MARINE AND FRESHWATER
SEDIMENTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avgušтина, za recenzenta pa prof. dr. Franca Viktorja Nekrepa.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Recenzent: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIČ-MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 15. september 2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nina Klemenčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26:579.68(043)=863
KG	mikrobna ekologija/vodna mikrobiologija/sedimenti/Koški bajer/Piranski zaliv/mikrobna raznolikost/bakterije/16S rDNK/PCR/ARDRA/ <i>in silico</i> /RDP II
AV	KLEMENČIČ, Nina
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/NEKREP, Franc Viktor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	FENOTIPSKA IN GENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH IZOLATOV IZ MORSKIH IN SLADKOVODNIH SEDIMENTOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 80 str., 12 sl., 17 pregl., 11 pril., 69 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Ugotavljali smo raznolikost dela aerobne heterotrofne sedimentne mikrobne združbe, ki ga lahko izoliramo in gojimo s tradicionalno mikrobiološko metodo razredčevanja in gojenja na trdnih gojiščih. Iz sedimentov Koškega bajerja, Piranskega zaliva, kopališča ob strunjanskem pomolu ter blata z dna Strunjanskega potoka smo po večkratnem precepljanju pridobili 77 domnevno čistih kultur. Morske izolate smo gojili na šestih različnih oligotrofnih gojiščih, sladkovodne pa na dveh splošno uporabljenih, a ne oligotrofnih gojiščih. Iz domnevno čistih kultur smo izolirali DNK ter z uporabo širokospecifičnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov v verižni reakciji s polimerazo pomnožili 16S rDNK. Med 1,3 in 1,5 kbp dolge pomnožke smo hkrati razrezali z <i>Bsu</i>RI in <i>Hha</i>I, za kateri smo se odločili po <i>in silico</i> PCR in restrikcijski analizi 770 sekvenc-zadetkov iskanja po bazi RDP II z geslom <i>freshwater sediment</i>. Na podlagi podobnosti profilov dolžin restrikcijskih fragmentov smo izolate razvrstili v 13 skupin, od katerih je ena vsebovala izolate z različnimi ARDRA-profilom, ki jih nismo mogli uvrstiti v nobeno od ostalih skupin, druga pa izolate, pri katerih analiza restrikcijskih fragmentov ni dala elektroforetskega signala. Osem od preostalih 11 skupin je vsebovalo izključno morske ali izključno sladkovodne izolate, tri skupine pa izolate iz obeh ekosistemov. Večino izolatov smo lahko uvrstili v nekaj številnejših skupin. Iz obeh ekosistemov smo lahko na različnih gojiščih izolirali mikroorganizme s podobnimi ARDRA-profilom, ravno tako pa smo lahko na enakih gojiščih izolirali mikroorganizme z različnimi ARDRA-profilom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.26:579.68(043)=863

CX microbial ecology/aquatic microbiology/sediments/Koseški bajer/Bay of Piran/microbial diversity/bacteria/16S rDNA/PCR/ARDRA/*in silico*

AU KLEMENČIČ, Nina

AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ NEKREP, Franc Viktor (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB Univesity of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2006

TI PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF BACTERIAL ISOLATES FROM MARINE AND FRESHWATER SEDIMENTS

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 80 p., 12 fig., 17 tab., 11 ann., 69 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Diversity of the culturable part of the aerobic heterotrophic marine and freshwater sediment microbiota was studied after the isolation with traditional extinction-culture and plating techniques. 77 isolates were obtained from samples from Koseški bajer, Bays of Piran and Strunjan and a mud sample from a stream near Strunjan salterns. Six different oligotrophic seawater- or modified artificial-seawater-based media and two different common non-oligotrophic media were used to obtain marine and freshwater isolates. DNA was isolated from supposedly pure cultures and 16S rDNA was PCR-amplified using universally conserved bacterial primers. Approximately 1,3-1,5 kbp long PCR-products were simultaneously double-digested with *BsuRI* and *HhaI*, the choice of which was made after *in silico* PCR and restriction analyses of 770 sequences-hits of RDP II, Release 9 database query with search term(s) *freshwater sediment*. Based on ARDRA profile comparison, isolates were placed in 13 groups. One contained isolates with blank profiles and another which contained dissimilar isolates that could not be placed in any of the remaining 11 groups. Eight of those 11 groups contained isolates from either marine or freshwater sediments; 3 groups contained marine as well as freshwater isolates. The largest groups contained marine or freshwater isolates only. The observation that microbes with similar ARDRA profiles grew on different media and that microbes with differing ARDRA profiles grew on the same medium held for both ecosystems.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROBNI METABOLIZEM V SEDIMENTIH IN POVEZAVA Z VODNIM STOLPOM	4
2.2 PRISTOPI K PREUČEVANJU SEDIMENTNE MIKROBIOTE	8
2.3 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE SEDIMENTOV V SLOVENSKEM PROSTORU	16
2.3.1 Koseški bajer	17
2.3.2 Tržaški in Piranski zaliv	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV	21
3.1.1 Sladkovodni sediment	21
3.1.2 Morski sediment	21
3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE ČISTIH KULTUR	23
3.2.1 Sladkovodni sediment	23
3.2.2 Morski sediment	23
3.3 FENOTIPSKI TESTI	25
3.3.1 Makromorfološki opis	25

3.3.2 Barvanje po Gramu	25
3.3.3 Barvanje endospor po Schaeffer in Fultonu	25
3.3.4 Test s 3-odstotnim kalijevim hidroksidom (KOH-test)	25
3.3.5 Katalazni test	26
3.4 IZOLACIJA DNK Z METODO PO AUSUBLU	26
3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)	27
3.6 HORIZONTALNA AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA	27
3.6.1 Agarozna gelska elektroforeza izolirane genomske DNK	27
3.6.2 Agarozna gelska elektroforeza produktov verižne reakcije s polimerazo	29
3.7 VIRTUALNI PCR IN VIRTUALNA RESTRIKCIJSKA ANALIZA	29
3.7.1 Nabor zaporedij	29
3.7.2 Virtualni PCR in obdelava zaporedij za virtualno restriksijsko analizo	30
3.7.3 Virtualna restriksijska analiza	32
3.8 RESTRIKCIJSKA ANALIZA POMNOŽENE RIBOSOMSKE DNK (ARDRA)	33
3.8.1 Dvojne restrikcije PCR-pomnožkov	33
3.8.2 Čiščenje produktov restrikcij z etanolno precipitacijo	34
3.8.3 Analiza produktov restrikcij z bioanalizatorjem Agilent 2100	34
3.8.4 Obdelava restriksijskih profilov	34
3.9 GOJIŠČA, RAZTOPINE, PUFRI, ENCIMI	36
3.9.1 Gojišča	36
3.9.2 Raztopine, pufri, encimi	37
3.9.2.1 Barvanje po Gramu	37
3.9.2.2 Barvanje endospor po Schaeffer in Fultonu	38
3.9.2.3 Izolacija DNK	38
3.9.2.4 Horizontalna agarozna gelska elektroforeza	39

3.9.2.5	ARDRA	39
4	REZULTATI	41
4.1	IZOLACIJA IN GOJENJE ČISTIH KULTUR	41
4.1.1	Sladkovodni sediment	41
4.1.2	Morski sediment	42
4.2	FENOTIPSKI TESTI	44
4.3	IZOLACIJA MIKROBNE DNK IZ ČISTIH KULTUR	46
4.4	POMNOŽEVANJE 16S rDNK S PCR	48
4.4.1	Pomnoževanje 16S rDNK sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja	48
4.4.2	Pomnoževanje 16S rDNK morskih sedimentnih izolatov	52
4.4.3	<i>In silico</i> analiza specifičnosti uporabljenih začetnih oligonukleotidov	53
4.5	VIRTUALNI PCR IN VIRTUALNA RESTRIKCIJSKA ANALIZA	55
4.5.1	Nabor sekvenc	55
4.5.2	Virtualni PCR	57
4.5.3	Virtualna restrikcijska analiza	58
4.6	ARDRA	59
4.6.1	Obdelava restrikcijskih profilov	59
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	65
5.1	RAZPRAVA	65
5.2	SKLEPI	70
6	POVZETEK	72
7	VIRI	74
	ZAHVALE	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1:	
Primerjava koncentracije najbolj zastopanih anorganskih sestavin v morski in rečni vodi (Schlesinger, 1997; Ehrlich, 2002)	4
Preglednica 2:	
Zahteve, ki jih mora izpolnjevati (kandidat za) molekularni kronometer (Eisen, 1995; Woese, 2000)	13
Preglednica 3:	
Količina materiala, uporabljena pri pripravi vzorcev	24
<u>Preglednica 4:</u>	
Uporabljeni začetni oligonukleotidi	28
<u>Preglednica 5:</u>	
Program PCR	28
Preglednica 6:	
Uporabljene restriktaze, organizmi, od koder so bile izolirane, prepoznavna zaporedja in restrikcijska mesta ter tip koncev, ki nastanejo po restrikciji (W=A, T)	35
Preglednica 7:	
Sestava gojišč, ki so temeljila na umetni morski vodi (ASW)	37
Preglednica 8:	
Aerobni heterotrofni izolati iz sedimentov Koseškega bajerja ter makromorfološki opis domnevno čistih kultur	41
Preglednica 9:	
Aerobni izolati iz morskih sedimentov ter blata z dna Strunjanskega potoka	42
Preglednica 10:	
Rezultati barvanja po Gramu, katalaznega testa in testa s 3-odstotnim KOH ter mikromorfološki opis domnevno čistih kultur sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja	44
Preglednica 11:	
Uspešnost izolacije genomske DNK ter pomnoževanja 16S rDNK s štirimi pari začetnih oligonukleotidov za sedimentne izolate iz Koseškega bajerja	49
Preglednica 12:	
Uspešnost izolacije genomske DNK ter pomnoževanja 16S rDNK z dvema paroma začetnih oligonukleotidov za morske sedimentne izolate	52
Preglednica 13:	
Odstotek sekvenc, daljših ali enakih 1200 bp, ki jih lahko	

	odkrijemo z začetnimi oligonukleotidi fD1, Eub338f, 1392r in R-1401 v bazi RDP II.9 pri dopuščenem nobenem, enem, dveh ali treh neujemanjih	53
Preglednica 14:	Število zadetkov v posamezni taksonomski kategoriji pri iskanju po bazi podatkov o dolžini in sekvenci 16S rDNK z nizom <i>freshwater sediment</i>	56
Preglednica 15:	Število sekvenc v bazi podatkov in število sekvenc z vsaj enim tarčnim zaporedjem (=in silico PCR-pomnožkov); število sekvenc s tarčnima zaporedjema za fD1 in 1401r (=število popolnih in silico PCR-pomnožkov); število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za fD1 in ne tudi za 1401r ter število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za 1401r in ne tudi za fD1; število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje za fD1 (1401r) ali oba začetna oligonukleotida in pripadajoči odstotki	57
Preglednica 16:	Število in odstotek edinstvenih (EP), needinstvenih (NP) in ničelnih (NiP) profilov restrikcijskih mest po virtualni restrikciji popolnih in silico PCR-pomnožkov z eno, dvema, tremi ali štirimi restriktazami	59
Preglednica 17:	Skupine izolatov glede na restrikcijske profile PCR-pomnožkov z oligonukleotidnim parom fD1/1401r	62

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Globinski profili O_2 , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} , Mn^{2+} , Fe^{2+} in CH_4 v sladkovodnem in morskem sedimentu (Nealson, 1997)	5
Slika 2: Koseški bajer (Koseški bajer, 2006)	18
Slika 3: Lokacija Koseškega bajerja (Thaler, 2006)	18
Slika 4: Vzorčevalne lokacije v Koseškem bajerju (Kučina in sod., 2000)	21
Slika 5: Območje vzorčenja za pridobitev morskih sedimentnih vzorcev (Interaktivni zemljevid Slovenije, 2006)	22
Slika 6: Gravitacijski koror za vzorčenje sedimenta s plovila (MBP Piran, 2006)	22
Slika 7: Izpis rezultatov iskanja domnevnih PCR-pomnožkov pri danih zaporedjih nukleinskih kislin in para začetnih oligonukleotidov z virtualnim PCR v programu FastPCR (Kalendar, 2006)	33
Slika 8: Elektroforetska ločitev mikrobne genomske DNK iz domnevno čistih kultur izolatov iz sedimentov Koseškega bajerja	47
Slika 9: Elektroforetska ločitev mikrobne genomske DNK iz domnevno čistih kultur izolatov iz sedimentov Piranskega zaliva, kopališča ob strunjanskem pomolu in blata z dna Strunjanskega potoka	48
Slika 10: Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK s PCR in začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1401r	49
Slika 11: Dendrogram za 70 sedimentnih izolatov, narejen s programskim paketom NTSYS-pc v1.8 (Exeter Software)	61
Slika 12ab: Elektroferograma, normirana gela in preglednici dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata VP3(22) LB in VP4b(22) LB	63

KAZALO PRILOG

PRILOGE: Elektroferogrami, normirani geli in preglednice dolžin restrikcijskih fragmentov za posamezne izolate iz skupin **I-XI**

- Priloga A:** Skupina **I** (ASWG5 in SW2)
Priloga B: Skupina **II** (OB1(22) LB in BO2(22) M9+Glc)
Priloga C: Skupina **III** (ASWK14 in VP1(22) LB)
Priloga D: Skupina **IV** (ASWK10 in NS2(22) LB)
Priloga E: Skupina **V** (VP3(22) LB in VP4b(22) LB)
Priloga F: Skupina **VI** (SWK13 in ASWG5)
Priloga G: Skupina **VII** (VP2(22) LB in ASWK6)
Priloga H: Skupina **VIII** (OB3(22) LB in RT1(22) LB)
Priloga I: Skupina **IX** (KJ4 (422) LB in MR1(22) LB)
Priloga J: Skupina **X** (BD1(22) LB in RT4(22) LB)
Priloga K: Skupina **XI** (BO3(22) LB in SK2(22) LB)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ARDRA	restriksijska analiza pomnožene ribosomske DNK (<i>angl.</i> amplified ribosomal DNA restriction analysis)
ASW	umetna morska voda (<i>angl.</i> artificial seawater)
ASW+Glc	umetna morska voda z glukozo
ASW+Kaz	umetna morska voda s kazeinom
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
D	Diceov koeficient
DNK	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid, DNA)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (<i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
EP	edinstveni profil
EtBr	etidijev bromid
EtOH	etanol
FKI	fenol-kloroform-izoamilalkohol
Glc	glukoza
H₂O₂	vodikov peroksid
J	Jaccardov koeficient
Kaz	kazein
KOH	kalijev hidroksid
LB	Luria-Bertani
M9+Glc	sol M9 z glukozo
MBP	Morska biološka postaja
MQ	Milli-Q
N	število sekvenc s tarčnim zaporedjem za fD1, 1401r ali oba (=število <i>in silico</i> PCR-pomnožkov)
N_{fD1/1401r}	število sekvenc s tarčnima zaporedjema za fD1 in 1401r (=število popolnih <i>in silico</i> PCR-pomnožkov)
N_{fD1}	število sekvenc s tarčnim zaporedjem zgolj za fD1

N_{1401r}	število sekvenc s tarčnim zaporedjem zgolj za 1401r
N'_{fD1}	število sekvenc s tarčnim zaporedjem za fD1; $N'_{fD1} = N_{fd1} + N_{fD1/1401r}$
N'_{1401r}	število sekvenc s tarčnim zaporedjem za 1401r; $N'_{1401r} = N_{1401} + N_{fD1/1401}$
NiP	ničelni profil
NP	needinstveni profil
PEHD	polietilen visoke gostote (<i>fr.</i> polyéthylène – haute densité)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
rDNK	ribosomska DNK(<i>angl.</i> ribosomal DNA, rDNA)
RDP II.9	Ribosomal Database Project II, Release 9
RNK	ribonukleinska kislina (<i>angl.</i> ribonucleic acid, RNA)
rRNK	ribosomska RNK (<i>angl.</i> ribosomal RNA, rRNA)
SAHN	<i>angl.</i> sequential, agglomerative, hierarchical, nested (clustering methods)
SM	preprosti koeficient (<i>angl.</i> simple matching)
SW	morska voda (<i>angl.</i> seawater)
SW+Glc	morska voda z glukozo
SW+Kaz	morska voda s kazeinom
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan
UPGMA	netehtana aritmetična sredina parnih skupin (<i>angl.</i> unweighted pair-group method, arithmetic mean)
V_{sn}	volumen supernatanta
ZO	začetni oligonukleotid

1 UVOD

Večino morskih in sladkovodnih sedimentov naseljuje genotipsko in fenotipsko raznolika mikrobna združba, ki vstopa v številne interakcije med seboj in z biotopom, vpliva pa tudi na interakcije med anorganskimi sestavinami ekosistema. Strukturo in aktivnost mikrobnih združb lahko v kompleksnih ter prostorsko in časovno spremenljivih ekosistemih, kamor sodijo tudi sedimentna okolja, preučujemo z metodami, ki so od izolacije in gojenja mikroorganizmov odvisne ali neodvisne. S kombiniranim pristopom ter razumevanjem dosega in omejitev uporabljenih metod tako učinkovito spoznavamo mikrobna okolja z različnih vidikov. Poznavanje taksonomije mikroorganizmov – posebno v neperturbiranih okoljih in ne le v slovenskem prostoru – je bistveno za vključitev mikrobne komponente v koncept biološke raznolikosti. Uveljavitev molekularnih metod v mikrobni ekologiji je ključno pripomogla k prepoznavanju globalne premoči mikroorganizmov po raznolikosti in biomasi, funkcionalni in genetski potencial mikroorganizmov pa najbrž tudi presega potencial višjih organizmov (Torsvik in sod., 1996).

Mikrobnotaksonomske in ekološke raziskave sedimentov v slovenskem prostoru so redke in nepovezane. Študije sedimentnih ekosistemov so večinoma usmerjene k spoznavanju flore in favne ali preučevanju (bio)geokemijskih in geomikrobnih procesov ter vpliva mikrobne metabolne aktivnosti na makrobioto. Z mikrobioto v ekosistemih se šele spoznavamo.

Namen pričujočega dela je bil z uporabo molekularnih ter nekaterih uveljavljenih in preprostih, toda delovno intenzivnih fenotipskih metod preučiti in primerjati bakterijske izolate iz sedimentnih vzorcev različnih delov Piranskega zaliva *sensu lato* in Koseškega bajerja. Spoznanja naj bi nudila osnovo in spodbudo za nadaljnje, bolj usmerjene raziskave, za katere je upati, da bodo dodale kamenček v mozaik poznavanja biološke pestrosti oziroma tistega, kar povezujemo s pojmom biodiverziteta.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Zanimali sta nas pestrost in raznolikost aerobnih kemotrofnih bakterij, ki jih lahko izoliramo iz površinskih slojev morskih in sladkovodnih sedimentov ter gojimo na agariziranih gojiščih v laboratorijskih pogojih.

Pričakovali smo, da se bodo izolati iz morskih in sladkovodnih sedimentov med seboj razlikovali in da bo na podlagi rezultatov genotipske analize mogoče večino izolatov razvrstiti v nekaj večjih skupin, ostale pa v skupine z manjšim številom članov.

2 PREGLED OBJAV

Usedline ali sedimenti so nesprijeti ostanki organskega in anorganskega detritnega in raztopljenega materiala; v diagenezi ohranijo nekatere značilnosti območja, od koder izvirajo, ter pridobijo druge, npr. med transportom ali v mikrobnih transformacijah. Diagenezo imenujemo spremembe v kemijski sestavi sedimentov po depoziciji (Schlesinger, 1997). Sedimenti so kopenskega ali morskega izvora. Kopenske, ki ostanejo v kontinentalnih bazenih in litificirajo v sedimentne kamnine, imenujemo terestrični; če se odlagajo na oceanskem dnu, so terigeni. Morski sedimenti so pelaškega ali bentoškega izvora, nastali v biogeokemijskih procesih v oceanih. Po načinu nastanka so klastični, avtigeni (kemični) in biogeni. Ne glede na način nastanka ter izvorno in depozicijsko mesto so vsi sedimenti podvrženi recikliranju na stičiščih tektonskih plošč (Smithson in sod., 2002).

Kot sediment lahko označimo tudi vse delce, ki se prenašajo s tokom in končno odložijo (deponirajo) na dno vodnega telesa. Delci, ki potujejo s tokovi nadslojenega vodnega telesa, se s posedanjem izključujejo iz transporta oziroma kroženja hranil v vodnem stolpu, vstopajo pa v prehranski splet v sedimentu. Najmanjšo hitrost, potrebno za transport delcev, imenujemo hitrost posedanja (w). Odvisna je od gostote delca (ρ_D) in medija (ρ_M), polmera delca (r) in dinamične viskoznosti (μ) tekočine. g je gravitacijski (težnostni) pospešek. Zvezo med njimi podaja Stokesova enačba, $w = [2(\rho_D - \rho_M)gr^2]/9\mu$. Če je w manjša od hitrosti toka tekočine, se delec transportira nizvodno; če je večja, sedimentira.

Sedimenti so kompleksni ekosistemi, spremenljivi v času in prostoru (Black in sod, 2002). Prostorsko spremenljivost – ta vpliva na porazdelitev potencialnih hranil ter biološko aktivnost – povzročajo lokalizirano mešanje zaradi bioturbacije in bioirigacije, podvodnega vulkanizma, tektonskih premikov. Časovna spremenljivost se kaže npr. v nihanju količine organske snovi, ki pride v sediment in spreminjanju strukture in aktivnosti sedimentne mikrobiote. V daljšem časovnem obdobju je moč zaznati ponovljivost (z manjšimi odstopanji) in razbrati vzorce – periodičnost/cikličnost.

2.1 MIKROBNI METABOLIZEM V SEDIMENTIH IN POVEZAVA Z VODNIM STOLPOM

Značilnosti in obseg bioloških procesov in kroženje hranil v sedimentih ter povezava med sedimenti in vodnim stolpom (Kemp in sod., 1999) so pod vplivom kemijskih in fizikalnih lastnosti sedimenta in vodnega stolpa, te pa pod vplivom matične podlage, kemijske sestave in višine nadslojenega vodnega telesa, alohtonih (npr. rečni vnosi, zemeljski plazovi, industrijski in kmetijski vtoki) in avtohtonih (primarna in sekundarna produkcija v vodnem stolpu, količina in kvaliteta deponirane organske snovi) vnosov v vodno telo. Lastnosti, količina in dotok organske snovi v sedimentu bistveno vplivajo na njeno razgradnjo. Pri lastnostih mislimo predvsem na dostopnost, dovzetnost za razgradnjo in razmerje med ogljikom in dušikom.

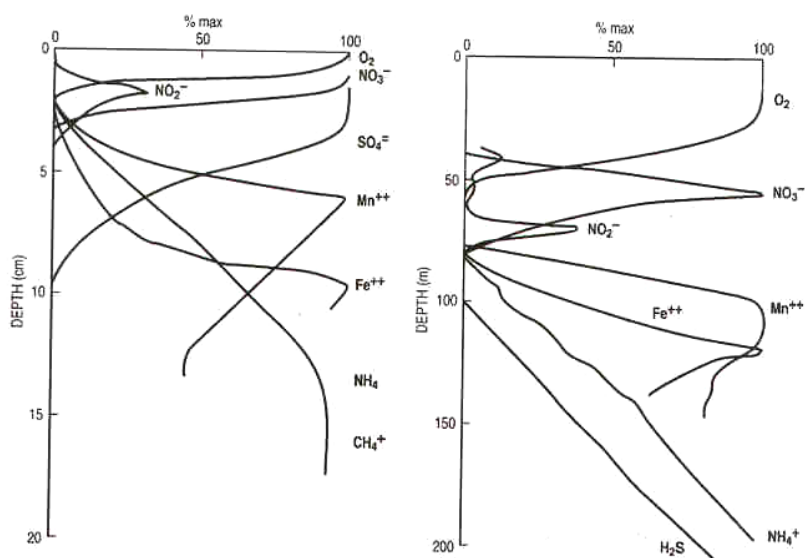
Razlike v koncentraciji anorganskih sestavin sladkih (celinskih) voda in morske vode (**Preglednica 1**) vplivajo na profile potencialnih hranil v sladkovodnih in morskih sedimentih. Značilni vertikalni profili potencialnih intermediatov v mikrobnem energetskem metabolizmu so rezultat biološke aktivnosti in hkrati nanjo vplivajo. **Slika 1** primerja spreminjanje koncentracije O_2 , NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} , Mn^{2+} , Fe^{2+} in CH_4 z naraščajočo globino v sladkovodnem in morskem sedimentu.

Preglednica 1: Primerjava koncentracije najbolj zastopanih anorganskih sestavin v morski in rečni vodi (Schlesinger, 1997; Ehrlich, 2002). **Preglednica 1** se nadaljuje na naslednji strani.

Sestavina	V morski vodi	V rečni vodi ¹
	[kg ⁻¹]	[kg ⁻¹]
Cl	19,35 g	5,75 mg
Na	10,76 g	5,15 mg
SO ₄ ²⁻	2,71 g	8,25 mg
Mg	1,29 g	3,35 mg
Ca	412 mg	13,4 mg
K	399 mg	1,3 mg
HCO ₃ ⁻	145 mg	52 mg

Sestavina	V morski vodi	V rečni vodi ¹
	[kg ⁻¹]	[kg ⁻¹]
Sr	7,9 mg	0,03 mg
B	4,6 mg	0,01 mg
F	1,3 mg	0,10 mg
Si	3 mg	7,5 mg (kot SiO ₂)
Fe	3 µg	0,8 mg
N	0,67 mg	3,7 mg (kot NO ₃ ⁻)

¹Rečna voda služi za ponazoritev sestave sladke/celinske vode; dejanska sestava jezerske vode je odvisna od podlage, sestave pritokov, morebitnih komunalnih odpadkov, atmosferske depozicije, itn.



Slika 1: Globinski profili O₂, NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, SO₄²⁻, Mn²⁺, Fe²⁺ in CH₄ v sladkovodnem (levo) in morskem (desno) sedimentu. (Nealson, 1997)

Obema ekosistemoma je skupen oksigeniran vrhnji sloj, ki je v stiku z vodnim telesom in kjer poteka aerobna respiracija. V globokomorskih (>1000 m; Madigan in sod., 2003) sedimentih, kjer se koncentracija kisika v pelaškem območju izven evfotske cone le malo spreminja, količina in dotok organskega ogljika pa sta nizka, sega aerobni sloj nekaj centimetrov pod površino (Nealson, 1997). Nasprotno pa v sedimentih plitvih ali (hiper)evtrofnih vodnih teles,

kjer koncentracija kisika sezonsko ali dnevno niha, oksigenirani sloj sega le nekaj milimetrov pod površino sedimenta (Brinkhoff in sod., 1998; Köpke in sod., 2005). Na vrhnji sloj so omejeni od kisika odvisni evkariontski mikroorganizmi (npr. glive – *Hormodendrum*, *Penicillium*, *Fusarium*; Litchfield in Floodgate, 1975) in višji organizmi. Med gojenimi in opisanimi prokariontskimi mikroorganizmi v tem sloju najdemo aerobne heterotrofne predstavnike iz rodov *Bacillus* (Atlas in Bartha, 1998; Nealson, 1997), *Pseudomonas* (Litchfield in Floodgate, 1975; Nealson, 1997), *Achromobacter* in *Flavobacterium* (Litchfield in Floodgate, 1975) med kemolitotrofi pa npr. *Ralstonia eutropha*, *Paracoccus denitrificans*, *Shewanella putrefaciens* (Nealson, 1997). Gradientni mikroorganizmi, ki se umestijo v območje prekrivajočih se gradientov hranil, »tekmujejo« s spontano – kemijsko – oksidacijo le-teh. Dobro opisan je nasprotni in prekrivajoči se gradient sulfida in kisika (Thar in Kühl, 2002). V interfazi oz. oksično-anoksičnem prehodnem območju (*angl.* oxic-anoxic transition zone, OATZ; Spring in sod., 2000) s prepletanjem filamentov nastajajo tančice ali preproge. Značilna rodova sta *Thiothrix* spp. in polzeča *Beggiatoa* spp. ter običkani in s pecljem pritrjeni *Thiovulum majus* (Spring in sod., 2000; Thar in Kühl, 2002). V odsotnosti svetlobe so združevanje v tančice dokazali tudi pri škrlatnem žveplovm fototrofu *Marichromatium gracile* (Schulz in sod., 1999). Z uporabo kompleksnega gojišča s sulfidom znotraj gradientne komore v plitvini na dnu zaliva Nivå na Danskem sta Thar in Kühl (2002) uspela obogatiti, toda (še) ne izolirati v čisti kulturi, vrsto neobarvanih, gramnegativnih, vibrioidnih, polarno politriho običkanih in obligatno mikroaerofilnih bakterij. Prostoživeče celice so pri koncentraciji O_2 2 μM izločale mukozne peclje, s katerimi so se pritrdile na površino in zlepljale med seboj. Pritrjene celice so lahko prilagajale dolžino peclja.

Nasprotni, a neprekrivajoči se gradient je sulfid-nitratni. Nanj so se filamentozne žveplove bakterije *Thioploca* spp. prilagodile tako, da se trihomi iz ovojnice iztezajo v vodni stolp in v vakuolah kopičijo NO_3^- , ki služi kot terminalni akceptor elektronov pri oksidaciji sulfida v globljih plasteh (Jørgensen in Gallardo, 1999; Thar in Kühl, 2002). Podobno *Thiomargarita namibiensis* uskladišči nitrat v vakuoli, ko je zaradi mešanja sedimenta izpostavljena z nitratom bogati vodi. Sloj NO_3^- v sedimentnem stolpu nastopi v mikrooksičnih in anoksičnih

pogojih. Tu najdemo (mikroaerofilne) nitritacijske (npr. *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*) in nitratacijske (*Nitrospina*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*) prokarionte (Madigan in sod., 2003; Nealson, 1997). Mikrooksično območje naseljujejo tudi metilotrofni in metanotrofni prokarionti.

V nižjih, anoksičnih slojih so prisotni le prokarionti. Poglavitna razlika med morskimi in sladkovodnimi sedimenti je v koncentraciji SO_4^{2-} in CH_4 , pa tudi v koncentraciji Mn^{2+} , Fe^{2+} in drugih elementov obstajajo znatne razlike. Zaradi visoke (25 mM) (Nealson, 1997; Atlas in Bartha, 1998; Schlesinger, 1997; Ehrlich, 2002) koncentracije SO_4^{2-} v porni vodi morskega sedimenta, energetsko ugodnejše redukcije sulfata v primerjavi z metanogenezo ter večje uspešnosti sulfat reducirajočih prokariontov (SRP) v primerjavi z metanogenimi arhejami pri izrabi skupnega elektronskega donorja (H_2) območje metanogeneze nastopi šele, ko je sulfat izčrpan (Nealson, 1997).

Poglavitni donator elektronov v sedimentih je organska snov. Za sedimentno organsko snov, nastalo v primarni produkciji (PP) istega vodnega telesa, pravimo, da je avtohtona. Večina izvira iz aktivnosti oksigenih fototrofnih (mikro)organizmov v evfotskem območju. Le-to je opredeljeno z globino, do katere prodre zadostna količina svetlobe (nekako 1 % vrednosti intenzitete na površini), ki še omogoča fotosintezo. Del primarno producirane organske snovi, ki je ne porabijo primarni producenti, je na voljo sekundarnim producentom – kemoorganotrofnim mikroorganizmom in višjim organizmom - in se reciklira v evfotskem območju, del pa z odmrliimi organizmi, makroagregati in fekalnimi peleti (detrit) tone proti sedimentu. Med tonjenjem je detrit podvržen razgradnji, zato se tok delcev z naraščanjem globine vodnega stolpa zmanjšuje. V sediment na globini 4000 m tako dospe le 1 % v evfotskem območju producirane organske snovi, trajno pa se deponira < 0,5 % (Schlesinger, 1997).

Sedimenti izven evfotskega območja so »odvisni« od alohtone ali prejete površinske organske snovi, v okolici hidrotermalnih vrelcev pa prehranjevalni spleti temeljijo na

kemoavtolitotrofiji (Madigan in sod., 2003; Nealson, 1997).

Dejavniki, ki (de)stabilizirajo naravne sedimente, so posledica aktivnosti bentoške makrofavne in makroflоре ter bentoške/sedimentne mikrobiote. Black in sod. (2002) povzemajo povezavo med biološko aktivnostjo sedimentov ter erozijskim potencialom sedimentov, kar vključuje prepoznavanje bio(de)stabilizacijskih dejavnikov. Med biostabilizacijskimi dejavniki omenjajo izločanje biopolimerov pretežno mikrobnega izvora (npr. EPS). Ti spremenijo površinske lastnosti sedimentnih delcev, da sta favorizirani adhezija in flokulacija, zaradi večjega premera in mase pa odlaganje. Odloženi delci so izvzeti iz transporta. Oblaganje delcev z biopolimernimi plastmi spremeni obliko izpostavljene površine. Filamentozna (mikro)biota utrjuje sedimentni matriks s povezovanjem delcev v mreže. Rast na površini sedimenta v obliki skorij ali tančic (Spring in sod., 2000; Thar in Kühl, 2002) lahko predstavlja zaščito pred erozijo, bodisi neposredno bodisi posredno z vplivanjem na tok tekočine. Primer bidestabilizacijskega vpliva – ki pa poveča oksigeniranost plasti, kjer poteka – sta bioturbacija in bioirigacija. Med bioturbacijske aktivnosti spadajo kopanje rogov in jaškov ter prenašanje in sortiranje delcev. Izvaja jo bentoška in sedimentna makrofavna (Hines in sod., 1997), ki je vezana na prisotnost kisika. Zaradi obligatno aerobne narave bioturbatorjev in omejenosti njihovih aktivnosti na vrhnje, oksigenirane sloje sedimenta, je iz bioturbacije izvirajoč destabilizacijski vpliv omejen na površinske plasti sedimenta.

Toda bioturbacija ima tudi stabilizacijski učinek. Kaže se v večji konsolidaciji sedimenta zaradi odtekanja v rogovih in jaških zbrane vode (drenažni efekt) ter povečane gostote zaradi prenašanja in sortiranja delcev. K nastajanju sedimenta (odlaganju delcev) prispevajo tudi organizmi, ki požirajo v vodnem stolpu suspendirani material.

V splošnem so mikrofitobentonti in sedimentne bakterije stabilizatorji, bentoška favna pa destabilizatorji sedimenta (Black in sod., 2002).

2.2 PRISTOPI K PREUČEVANJU SEDIMENTNE MIKROBIOTE

Od spoznanja dalje, kako majhen delež (glede na ekosistem od 0,001 do 15 %, iz sedimentov 0,25 % (Amann in sod., 1995; Atlas in Bartha, 1998; Tamaki in sod., 2005)) okoljskih mikroorganizmov, ki nimajo neposrednega kliničnega oz. komercialnega pomena, je moč (vz)gojiti in pravilno identificirati oziroma karakterizirati s t. i. tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami, je poleg streznitve prišlo do razvoja metod, ki omogočajo (mikro)biološko spoznavanje do sedaj nepreučenihi ekosistemov (npr. globokomorski in polarni sedimenti) in svež pogled na že preučevane ekosisteme (npr. tla, ocean).

Tradicionalne mikrobiološke metode tu razumemo kot izolacijo čistih kultur ali definiranihi sokultur (Amann in sod., 1995) iz bogatitvenih kultur ali po inokulaciji posameznih redčitvi vzorca na trdna, običajno agarizirana, gojišča. Slednje temelji na ločitvi – idealno posameznih – celic na površini hranilne plošče, iz katerih se razvijejo fenotipsko različne in različne populacije (Atlas in Bartha, 1998).

Sredstvo za strjevanje gojišč ni nujno le agar-agar; kot primer naj navedemo uporabo silikagela (Pramer, 1957) in t. i. *gellan guma*. Tamaki in sod. (2005) so z uporabo slednjega pri preučevanju pestrosti bakterij v sedimentih evtrofnega sladkovodnega jezera vzgojili od 2,2 do 12,6-krat (v aerobnih pogojih) oziroma od 1,3 do 21,3-krat (v anaerobnih pogojih) več kolonij kot na enakih agariziranihi gojiščih. Pomembno – na gojiščih z *gellan gumom* je bila pri aerobni inkubaciji pestrost izolatov večja v primerjavi s pestrostjo na agariziranihi gojiščih. V obeh primerih so izolate lahko uvrstili v pet bakterijskih filogenetskih linij, od katerih so bile tri proteobakterijske (alfa, beta in gama), toda v primeru *gellan guma* sta bili ostali skupini *Bacteroidetes* in *Plancomycetes*, v primeru agarja pa *Actinobacteria* in *Firmicutes*. V obeh primerih so tri najštevilčnejše skupine izolatov (alfa- in betaproteobakterije ter bakteroidete oz. alfa-proteobakterije, aktinobakterije in firmikuti) zajele preko 93 % izbranihi izolatov.

Teoretično osnovo redčitvene tehnike (*angl.* dilution culture, extinction culture) pri izolaciji

bakterij iz morske vode so podali Button in sod. (1993). Utemeljili so jo na viabilnosti, sprva opredeljeni kot razmerje med številom živ(eč)ih in vseh izhodiščno prisotnih celicah in nato redefinirani kot verjetnost, da je naključno izbrana celica iz ravnokar nacepljene epruvete živ(eč)a. Na sedimentnih vzorcih sta redčitveno tehniko uporabila že Litchfield in Floodgate (1975).

Izolacijo z razredčevanjem izhodiščnega vzorca v tekočem gojišču so uspešno uporabili Burns in sod. (2004) pri izolaciji kvadratnih halofilnih arhej iz skupine *SHOW* (*angl. square haloarchaea of Walsby*), ki naj bi predstavljale dominantno skupino prokariontov v vodnem stolpu hiperslanih jezer, a jih do nedavnega ni bilo moč gojiti v laboratoriju. Izolat C23, ki ni rasel na trdnih gojiščih, so karakterizirali s svetlobno in elektronsko mikroskopijo, restrikcijsko analizo in sekvenciranjem gena za 16S rRNK.

Connon in Giovanonni (2002) sta koncept redčitvene tehnike prenesla v manjši volumen in oligotrofna gojišča ter razvila visokoproduktivno metodo za izolacijo in gojenje nekaterih še negojenih filotipov morskega bakterioplanktona, ki pa so pogosti v knjižnicah klonov. Metodo odlikujeta tudi krajši inkubacijski čas in zmožnost odkrivanja manjšega števila celic. Nekatere rodove pogosto izolirajo iz morske vode, pa *in situ* niso številčno dominantni. Taka sta npr. *Vibrio* in *Pseudomonas*; označujejo jih tudi kot "mikrobni plevel" (*angl. "microbial weeds"*; Madigan in sod., 2003). Connon in Giovanonni sta tak "plevel" zasledila le redko.

Drugo visokoproduktivno metodo za gojenje še negojenih mikroorganizmov so nedavno opisali Zengler in sod. (2002). Razvili so jo na planktonih iz Sargaškega morja, uporabili pa tudi na vzorcih tal in sedimenta iz alkalnega jezera. Metoda združuje vključitev celic v agarozne mikrokapsule (t.i. (mikro)enkapsulacija) (v približno 10 % mikrokapsul se je ujela po ena celica) in gojenje le-teh v oligotrofnem tekočem gojišču. Uspešnost enkapsulacije in rast mikrokolonij (20-100 celic v mikrokapsuli) so spremljali s pretočno citometrijo. Gojenje enkapsuliranih celic/mikrokolonij v skupnem prostoru omogoča komunikacijo med celicami/mikrokolonijami, čeprav so ločene; sistem za gojenje je odprt, s stalnim

dotokom/odtokom hranil; v kratkem času je mogoče pregledati veliko število mikrokapsul; s primerno opremo je ločevanje med “polnimi” in “praznimi” mikrokapsulami hitro in učinkovito.

Če je izolacija mikrobov iz vodnega stolpa pogosto neuspešna ravno na trdnih gojiščih (npr. Burns in sod., 2004), za sedimentno in talno mikrobioto velja obratno. Vpetost v sedimentni matriks iz peščenih (0,05-2 mm), meljnih (0,002-0,05 mm) in glinenih (2-0,002 μm) delcev (velikosti delcev veljajo za tla in so povzete po Atlas in Bartha, 1998; Chenu in Stotzky, 2002; Ehrlich, 2002), detrita in organskih polimerov otežuje pridobitev celic ali celičnih ekstraktov brez uporabe razmeroma grobih postopkov, kot so sonikacija, kroglični stresalnik (*angl.* bead-beating) ali centrifugiranje.

dos Santos Furtado in Casper (2000) sta primerjala različne metode za ekstrakcijo bakterijskih celic iz sladkovodnega sedimenta. Učinkovitost posamezne metode za ekstrakcijo celic iz okoljskega vzorca sta izračunala iz razmerja med številom celic v obdelanem in neobdelanem vzorcu (neposredno štetje, glej dalje). Največ bakterijskih celic sta pridobila iz vzorcev, centrifugiranih pri nizki hitrosti. Po kratkotrajni sonikaciji (ki smo jo tudi sami uporabili pri obdelavi vzorcev iz sedimenta Koseškega bajerja) s formalinom (končna koncentracija 3 %) obdelanih vzorcev se je število pridobljenih celic v primerjavi z nesonificiranimi vzorci zmanjšalo za tretjino. Število celic v soniciranih vzorcih, ki niso bili predhodno obdelani s formalinom, je padlo na šest odstotkov. Ugotovila sta obratno sorazmerje med številom ekstrahiranih celic in hitrostjo centrifugiranja. Centrifugiranje pri nizki hitrosti brez Percolla (s polivinilpirolidonom (PVP) prevlečeni delci (15-30 nm) silicijevega dioksida) je učinkovitejše od centrifugiranja v gradientu gostote Percolla in tudi najučinkovitejši način za ločitev mikrobnih celic od sedimentnega matriksa.

Prisotnost, število, biomaso in aktivnost mikroorganizmov v okoljskih vzorcih lahko neposredno in brez potrebe po izolaciji in gojenju ugotavljamo s fluorescentnimi tehnikami in molekularnimi metodami.

Pogosto uporabljana, predvsem pa preprosta in razmeroma natančna metoda za ugotavljanje števila celic v sedimentih in sedimentom podobnih vzorcih vključuje nespecifično označevanje celičnih nukleinskih kislin, npr. z akridinoranžnim (AO) (Chandler in sod., 1997; Madigan in sod., 2003); 4',6-diamidino-2-fenilindolom (DAPI) (dos Santos Furtado in Casper, 2000; Gich in sod., 2005; Gray in Herwig, 1996, Madigan in sod., 2003) ter fluoresceinizotiocianatom (FITC) in Hoechst 33258 (Atlas in Bartha, 1998) ter opazovanje pod epifluorescentnim mikroskopom. Razločevanje med celicami in ozadjem otežuje ali preprečuje adsorpcija molekul barvila na površine organskih in anorganskih koloidov ter detrita (Atlas in Bartha, 1998; dos Santos Furtado in Casper, 2000), kamor so lahko pritrjene tudi mikrobne celice (Chenu in Stotzky, 2002; Fajfar, 2006).

Kot pomemben preboj omenjajo vpeljavo molekularnih metod v mikrobno ekologijo, ki so – preko analize informacije v semantičnih molekulah (Torsvik in sod., 1996) na različnih ravneh ločljivosti – omogočile odkrivanje in identifikacijo mikroorganizmov neposredno v okoljskih vzorcih, brez potrebe po izolaciji in gojenju v čistih kulturah; preučevanje celokupne pestrosti in dinamike mikrobnih združb *in situ*; ekofiziologijo filogenetsko sorodnih mikrobnih skupin ali ugotavljanje filogenetskih odnosov med fiziološko samosvojimi mikrobnimi skupinami.

Neposredno lahko mikrobne celice v okoljskem vzorcu – *in situ* – izsledimo s fluorescentno označenimi oligonukleotidnimi sondami, katerih tarča so komplementarna zaporedja nukleinskih kislin. Metoda se imenuje fluorescentna hibridizacija *in situ* (*angl.* fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (Wagner in sod., 2003) in poleg odkrivanja omogoča tudi štetje ter ločevanje mikrobnih skupin glede na izbrani kriterij. Če tarča hkrati izpolnjuje tudi zahteve za molekularni kronometer (glej dalje), pridobimo informacijo o taksonomski poziciji odkritih celic. Široko- ali ozkospecifične filogenetske sonde (Torsvik in sod., 1996) omogočajo ugotavljanje prisotnosti organizmov iz posameznih filogenetskih linij. V kombinaciji s konfokalno lasersko mikroskopijo (*angl.* confocal laser scanning microscopy, CLSM) FISH omogoča rekonstrukcijo prostorske strukture mikrobne združbe (Madigan in sod., 2003; Wagner in sod., 2003). Modifikacija osnovne tehnike, ki kombinira mikroavtoradiografsko

spremljanje privzema radioaktivno označenih substratov (npr. ^3H -timidin, ^3H -levcin) in FISH (MAR-FISH) pa omogoča identifikacijo samosvojih metabolnih skupin ali ugotavljanje aktivnosti fizioloških skupin mikroorganizmov *in situ*.

Molekularni ali evolucijski kronometer je univerzalno prisotna in funkcionalno istovetna molekula, za katero je hitrost fiksacije mutacij, izražena kot hitrost spreminjanja nukleotidne ali aminokislinske sekvence, sorazmerna evolucijski razdalji med organizmi, zato lahko to molekulo uporabimo za ugotavljanje, preučevanje filogenetskih odnosov med organizmi z namenom razvozlanja naravnega taksonomskega sistema (naravne hierarhične klasifikacije, če obstaja) ali postavitve modelov, ki z večjo ali manjšo verodostojnostjo le-tega odsevajo. Zahteve, ki jih mora izpolnjevati (kandidat za) molekularni kronometer so navedene in razložene v **Preglednici 2**.

Preglednica 2: Zahteve, ki jih mora izpolnjevati (kandidat za) molekularni kronometer (Eisen, 1995; Woese, 2000)

Zahteva	Razlaga
Univerzalnost/ubikvitarnost	Prisotnost molekule pri vseh preučevanih organizmih.
Homolognost	Evolucijsko razdaljo med organizmi je smiselno meriti le, če izhajajo iz skupnega prednika
Funkcionalna invariantnost	Molekula pri vseh preučevanih organizmih opravlja identično funkcijo, ki mora biti enaka prvo(bi)tni
Sorazmernost spreminjanja sekvence z evolucijsko razdaljo	Hitrost fiksacije mutacij v DNK mora biti sorazmerna evolucijski razdalji, ki jo merimo
Odsotnost lateralnih prenosov	...predvsem medvrstnih
Množina v celici	Zadostna, da omogoča izolacijo
Poravnava sekvenc	Potrebna za ugotavljanje podobnosti in razlik (insercije, delecije, substitucije) v nukleotidni ali aminokislinski sekvenci
Število dostopnih sekvenc	Relevantni/zanesljivi zaključki so možni le, če medsebojno primerjamo zadostno število sekvenc; pomen prostodostopnih podatkovnih baz na svetovnem spletu

Molekularni kronometer je gen, del gena ali produkt gena. Uporabne so predvsem molekule, vključene v različne stopnje izražanja in prenosa genske informacije: koraki od gena do RNK ali proteina so namreč ubikvitarni, dobro ohranjeni in biološko esencialni, hkrati pa med organizmi/taksoni izkazujejo dovoljšnjo variabilnost, da omogočajo izpeljave zaključkov o filogenetskih odnosih (grupiranje organizmov na podlagi podobnosti).

Zakaj je RNK male ribosomske podenote (*angl.* small-subunit ribosomal RNA, SSU rRNA) postala, kot izgleda, centralna molekula v preučevanju evolucijskih razmerij med organizmi? Je ubikvitarna, sodeluje v sintezi proteinov, ki je najverjetneje ohranjen proces, njena funkcija je konstantna in enaka pri vseh do sedaj znanih organizmih, vsebuje spremenljive in nespremenljive regije, v celici je prisotna v velikem številu, razmeroma lahko jo je izolirati za preučevanje, geni za ribosomsko RNK naj ne bi podlegali lateralnim medvrstnim prenosom, obsežne baze podatkov (npr. Ribosomal Database Project II, RDP II; Cole in sod., 2005) pa omogočajo primerjavo velikega števila sekvenc (Eisen, 1995; Woese, 2000; Hugenholtz, 2002; Madigan in sod., 2003). Toda evolucija posameznega gena ne odraža nujno evolucije vrste (Eisen, 1995). Omenili smo že medvrstne lateralne prenose genov, ki jim, kot kaže, vendarle podlegajo tudi geni za rRNK (Nübel in sod., 1996); in četudi ne, pa jim podlegajo številni drugi (Eisen, 1995). Pri vrstah z več kot enim ribosomskim operonom morda med organizmi ne primerjamo ortolognih, marveč paralogne gene (Eisen, 1995). Kandidati za molekularni kronometer so tudi EF-Tu, Hsp70, GroEL, β -podenota ATP-aze, RNK-polimeraza, 23S rRNK, RecA (Eisen, 1995).

Številne tehnike in metode omogočajo spremljanje dinamike mikrobnih skupin v kompleksnih vzorcih in sledenje populacijskim premikom, odkrivanje in identifikacijo dominantnih skupin, ki pa jih še ne znamo gojiti, ali filogenetsko analizo bodisi izolatov bodisi mikroorganizmov v okoljskih vzorcih ali pripravkih iz okoljskih vzorcev. Prednost takega pristopa pred sekvenco analizo, ki ima sicer večjo ločljivost, je, da lahko hitro pregledamo veliko število vzorcev – je torej primeren za preliminarno analizo ali presejalne teste. V primerjavi s sekvenciranjem poleg časa prihranimo tudi finančna sredstva.

Mnoge tipizacijske tehnike in metode za preučevanje pestrosti v kompleksnih okoljih temeljijo na pomnoževanju nukleinskih kislin v verižni reakciji s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction, PCR). Z izbiro primernih začetnih oligonukleotidov lahko pomnožujemo tudi sekvence, ki so v vzorcu prisotne v majhnem številu (so "v ozadju") in njihov signal pomnožimo do zaznavne vrednosti. Na PCR temelječe metode pa so poleg specifičnih težav obremenjene še z vsemi pomankljivostmi PCR npr. zaradi nespecifičnega naleganja začetnih oligonukleotidov in občutljivosti polimeraze na inhibitorje (fenol, huminske spojine); fragmentiranost tarčne DNK poveča verjetnost nastanka himernih sekvenc – artefaktov pomnoževanja; možno je tudi preferenčno pomnoževanje nekaterih sekvenc.

Osnova gradientne gelske elektroforeze (*angl.* denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE; temperature gradient gel electrophoresis, TGGE; temporal temperature gradient (gel) electrophoresis, TTGE) (Torsvik in sod., 1996; Muyzer in Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Gelsomino in Cacco, 2006) je zmanjšanje elektroforetske mobilnosti delno denaturirane dvoverižne DNK v poliakrilamidnem gelu. Do delne denaturacije pride, ker je dvoverižna DNK izpostavljena pritisku zaradi linearnega naraščanja gradienta kemijskega denaturanta (mešanica uree in formamida; DGGE) ali temperature (TGGE) v gelu oziroma naraščanju temperature elektroforetskega pufra med potekom elektroforeze (TTGE). V preučevanju genetske pestrosti in dinamike mikrobnih združb se DGGE in izvedenke uporabljajo za ločevanje genov za 16S rRNK po namnoževanju direktno izolirane okoljske DNK z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi.

Restriksijska analiza pomnožene 16S rDNK (*angl.* amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) je ena izmed tipizacijskih tehnik, ki temeljijo na izdelavi in primerjanju profilov dolžin restriksijskih fragmentov, nastalih po rezanju z eno ali več restriksijskimi endonukleazami tipa II v PCR pomnoženega odseka ali celotne dolžine gena za 16S rRNK. Metoda je uporabna tako pri izdelavi prstnega odtisa združbe v okoljskem vzorcu kot tudi pri (presejalni) karakterizaciji in primerjavi neznanih izolatov. Slednje lahko na podlagi podobnosti ARDRA-profilov združujemo v skupine, iz katerih izberemo predstavnike za

sekvenciranje 16S rDNK, sekvence pa primerjamo z deponiranimi sekvencami gojenih sevov ali okoljskih klonov.

Če pri PCR-pomnoževanju 16S rDNK fluorescentno označimo začetni oligonukleotid na 5' strani tarčne sekvence, pomnožek pa razrežemo (običajno z restriktazo s tetranukleotidnim restrikcijskim mestom) in fragmente ločimo s kapilarno elektroforezo ali sekvenatorjem, dobimo profil dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov. Metoda se na kratko imenuje T-RFLP (*angl.* terminal restriction fragment length polymorphism) in je bolj kot za tipizacijo čistih kultur izolatov primerna za primerjalno preučevanje pestrosti in dinamike mikrobnih združb. Spletna stran RDP II omogoča simulacijo analize s T-RFLP (TAP T-RFLP) na deponiranih sekvencah 16S rRNK (Marsh in sod., 2000).

Reeves in sod. (1995) so ocenjevali tri pristope za filogenetsko karakterizacijo aerobnih, kemoorganotrofnih bakterijskih izolatov iz okolij pod površjem Zemlje. Namen je bil najti najboljšo metodo za predpresejalno testiranje (*angl.* prescreening) velikega števila izolatov, da bi izbrali predstavnike za kasnejše poglobljene analize (sekvenciranje). Najuporabnejše rezultate v smislu pravilnega prepoznavanja istovetnih ali bližnje sorodnih izolatov je dala sekvenčna analiza ~350 bp dolgih segmentov PCR-pomnožkov, dobljenih z uporabo širokospecifičnih začetnih oligonukleotidov. Restrikcijska analiza genomske DNK s štirimi različnimi restriktazami (v ločenih reakcijah) ter morfološko-fiziološko testiranje sta se izkazala kot manj uspešna.

2.3 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE SEDIMENTOV V SLOVENSKEM PROSTORU

Poznavanje sedimentnih, posebno sladkovodnih, ekosistemov slovenskega prostora z mikrobnotaksonomskega vidika je pomanjkljivo. Raziskav sladkovodnih sedimentov pogosto ne žene potreba po spoznavanju nedotaknjenih (neperturbiranih) ekosistemov, marveč spoznanje, da se v sedimentih akumulirajo in pretvarjajo za človekovo zdravje potencialno nevarni polutanti (Hines in sod., 2001) ali pa se sproščajo t.i. toplogredni plini, npr. metan

(Lojen in sod., 1999).

Več raziskav je bilo opravljenih na morskih sedimentih (Hines in sod., 1997; Kemp in sod., 1999), toda kot nam je znano, so se osredotočile na geokemijske parametre, biogeokemijske procese ter ugotavljanje mikrobne metabolne aktivnosti v sedimentih in njenega vpliva na bentoško floro in favno in ne na strukturo združbe ali povezavo strukture z aktivnostjo, s katero postavimo ugotavljanje funkcije ekosistema v perspektivo.

Banjac (2003) je z molekularnimi metodami primerjal bakterijske populacije v sedimentih treh visokogorskih jezer (Peto in Šesto Triglavsko jezero, Črno jezero). Uporabil je t.i. rRNK-pristop (*angl.* rRNA approach) (Amann in sod., 1995): neposredno iz okoljskega vzorca je izoliral celokupno mikrobno DNK in v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnožil gene za 16S rRNK. Začetni oligonukleotidi so bili univerzalni bakterijski (fD1, Eub338f, 522f, 1392r), specifični za razred alfa proteobakterij (*Alphaproteobacteria*) (Alpha1Br-Cy5) ali skupino *Cytophaga-Flexibacter-Flavobacterium* (CFBcf). Mešanice pomnožkov je razrezal z restriktazo *HaeIII* (GG/CC) in medsebojno primerjal restrikcijske profile vzorcev. Ugotovil je precejšnjo podobnost bakterijskih populacij med vzorci iz istega jezera; večjo podobnost med populacijami znotraj kot pa med jezери in odstopanje restrikcijskega profila vzorca iz bližine planinske koče, kar nakazuje občutljivost in odzivnost odmaknjenih, oligotrofnih visokogorskih jezer. Ne omenja, ali je preveril nastanek morebitnih himernih sekvenc, za katere se verjetnost nastanka povečuje z naraščanjem fragmentiranosti izolirane okoljske DNK (Gray in Herwig, 1996); še vedno tudi ostaja neznano, katerim mikrobnim skupinam »pripadajo« profili dolžin fragmentov 16S rDNK.

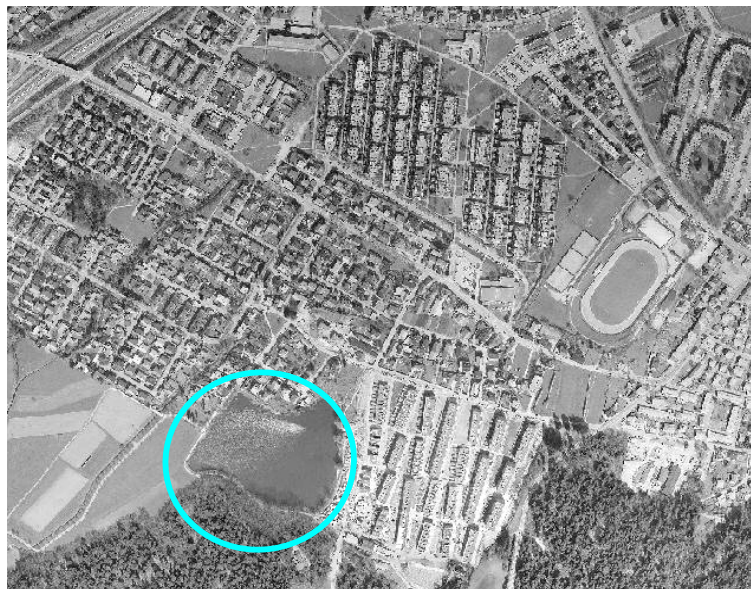
2.3.1 Koseški bajer

Koseški bajer (**Sliki 2 in 3**), tudi Martinek bajer, je opuščeni glinokop v Ljubljani, ki ga je pred približno 40 leti zalila voda. Površina bajerja je 3,8 ha. Edini vtok je na jugozahodnem delu bajerja, sprejema pa tudi površinske vode s širšega območja. Bajerska voda se izteka na

zahodnem delu v potok Pržanec in levi pritok Glinščice. Povirje Pržanca so zahodni obronki Šišenskega hriba oziroma širše območje Mosteca. Korito Pržanca je naravno, plitvo vrezano v podlago iz glinovcev in preperelega površinskega sloja. Erozijski procesi so zmerni in enakomerno porazdeljeni vzdolž potoka nad Večno potjo. Bajer se nahaja na prehodu iz dolinskega v ravninski del, tok Pržanca pa zvezno prehaja iz povirnega dela v dolino (Krivograd Klemenčič, 2001; Firbas, 2001).



Slika 2: Koseški bajer (Koseški bajer, 2006)



Slika 3: Lokacija Koseškega bajerja (Thaler, 2006)

Minimalne in srednje letne dotoke v Koseški bajer so, z upoštevanjem velikosti prispevnega območja, določili z merjenjem pretokov Glinščice na Vodomerni postaji Hidrometeorološkega zavoda (HMZ) Rožna dolina. Prispevna površina Koseškega bajerja je 1,01 km². Srednji letni pretok je 0,023 m³/s, srednji nizki pretok je 0,001 m³/s, minimalni pretok pa 0,000 m³/s (Krivograd Klemenčič, 2001).

Brežine bajerja so zemljate, na vzhodnem delu delno tlakovane. Bregovi so poraščeni z lesnimi rastlinami: vrbo (*Salix* sp. Skvort.), črno jelšo (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.), rdečim drenom (*Cornus sanguinea* L.), črnim bezgom (*Sambucus nigra* L.), dobom (*Quercus robur* L.), belim javorjem (*Acer pseudoplatanus* L.), ostrolistnim javorjem (*Acer platanoides* L.), topolom (*Populus* sp. L.). Litoral je peščen in zamuljen, voda kalna. Posamezni deli so poraščeni z trstom (trstičjem?) (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) in rogozom (*Typha* sp. L.) (Krivograd Klemenčič, 2001).

Krivograd Klemenčič (2001, 2002) je v letih 1998-2001 raziskovala taksonomsko pripadnost v vrstni sestavi in razširjenost planktonskih in perifitonskih (za definicije glej Krivograd Klemenčič, 2001 in citirane vire) alg posebnih okolij v Sloveniji. Vzorčila je sladkovodne (evtrofna jezera - Koseški bajer, Sotelsko jezero; visoka barja; slapovi; izviri), brakične (izliv reke Dragonje, priobalno jezero v Fiesi) in kopenske (hipertrofna okolja – rastlinska čistilna naprava, gnojevka; skale, zidovi, jame) ekosisteme. Raziskava je zajela tudi cianobakterije, ki so bile za potrebe dela uvrščene v enotno skupino Cyanophyceae (Cyanophyta = Cyanobacteria, Prokaryota). Iz Koseškega bajerja je vzela 5 vzorcev v mesecih avgustu (1998, 1999), maju (1999), oktobru (1999) in februarju (2000). Temperaturo, elektroprevodnost, pH, koncentracijo kisika in nasičenost s kisikom je izmerila med vzorčenjem avgusta in oktobra 1999 ter februarja 2000. V vseh planktonskih in perifitonskih vzorcih je skupno ugotovila 169 taksonov/vrst. Predhodno poimenovanih in v sistem uvrščenih cianobakterijskih predstavnikov je bilo 26 (15,38 %) in so bili umeščeni v rodove *Anabaena*, *Aphanothece*, *Calothrix*, *Gloeocapsa*, *Gomphosphaeria*, *Lyngbya*, *Merismopedia*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Spirulina* in *Synechocystis*.

2.3.2 Tržaški in Piranski zaliv

Tržaški zaliv je severovzhodni del Severnega Jadranskega morja, v katerega se na zahodu izliva reka Pad, na jugovzhodu Dragonja in Rižana, na severozahodu pa Soča in Timav. Površina Tržaškega zaliva je 480 m^2 , povprečne globina je okoli 20 m, maksimalna pa okoli 25 m. Slanost se giblje med 33 in 38,5 ‰. Letne temperature na dnu so med 8 in 22°C , z minimumom marca (zgodaj spomladi) in maksimumom septembra in oktobra (zgodaj jeseni) (Kemp in sod., 1999).

Hines in sod. (1997) so med oktobrom 1992 in septembrom 1993 spremljali razgradnjo organske snovi v površinskih sedimentih Tržaškega zaliva, kjer lahko pozno poleti pride do pomanjkanja kisika na dnu zaradi nastanka gradienta gostote morske vode in ločitve slabše premešanega bentosa/sedimentov od bolje premešanih in oksigeniranih površinskih slojev. Koncentracija kisika v bentoški vodi in posledično globina, do katere prodre v sediment, vpliva(ta) na pot in produkte razgradnje sedimentne organske snovi, skupaj s slednjim pa na aktivnost bentoške makrofavne.

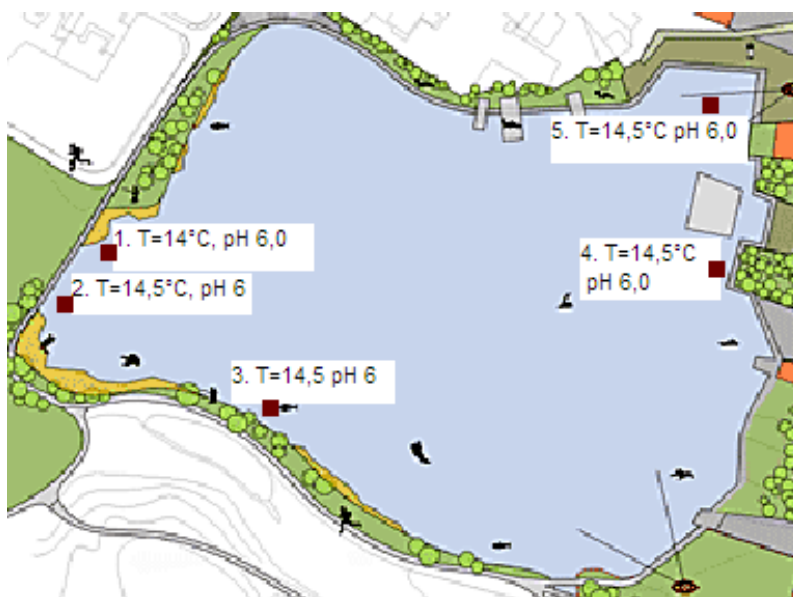
Ugotovili so, da sta v sedimentih Piranskega zaliva v hipoksičnih, predvsem pa v anoksičnih pogojih pomembna terminalna akceptorja elektronov Fe^{3+} in Mn^{4+} , zaradi visoke koncentracije pa še posebno SO_4^{2-} . V odsotnosti kisika, ki edini lahko reoksidira Fe^{2+} in Mn^{2+} , postane poglavitni terminalni akceptor elektronov SO_4^{2-} . Ta se reducira do elementarnega žvepla, ki se lahko kopiči znotrajcelično ali sulfida, ki se izloči v okolje. Bentoška makrofavna je tako poleg neugodnih vplivov pomanjkanja kisika izpostavljena še toksičnim vplivom zaradi kopičenja sulfida.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV

3.1.1 Sladkovodni sediment

Koseški bajer smo 26. oktobra 2005 vzorčili na petih lokacijah, ki so prikazane na **Sliki 4**. Na vsaki lokaciji smo s plastičnim korerjem (*angl.* corer) (dolžina 1 m, notranji premer približno 5 cm) odvzeli po eno sredico in takoj po odvzemu korer na obeh koncih zaprli s čepoma iz butilne gume. Do obdelave so bili korerji s sredicami shranjeni v škatli in niso bili hlajeni. Na vsaki lokaciji smo izmerili tudi temperaturo in pH.

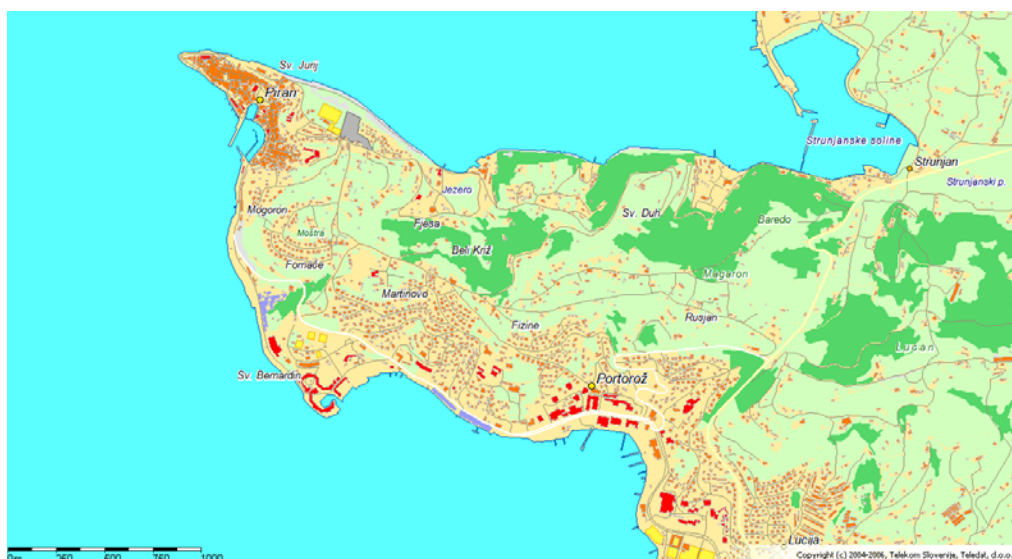


Slika 4: Vzorčevalne lokacije v Koseškem bajerju (BRUTO Landscape Architecture & Design, 2000)

3.1.2 Morski sediment

Vzorčili smo 26. oktobra 2004 na treh lokacijah, ki so prikazane na **Sliki 5**. Na prvi lokaciji je domačin v sterilizirane steklene kozarce zajel blato z dna Strunjanskega potoka v Strunjanskih

solinah blizu zaliva Sv. Duha. Na drugi lokaciji smo v plitvini ob betonskem pomolu v turističnem delu Strunjskega zaliva zajeli material z dna. Tretja lokacija je bila postaja 00MA (geografska pozicija: 45°30'20" in 13°34'20") Morske biološke postaje (MBP) Piran, 1500 m od obale. Dno je 16 m pod gladino. Sediment je sestavljen iz glinenih in peščenih delcev velikosti <50 µm in 50-100 µm (Ogorelec in sod., 1991). Sodelavci MBP Piran so z gravitacijskimi korerji (prozorni; dolžina 50 cm, notranji premer 4,2 cm, debelina 4 mm; čepi iz butilne gume) za vzorčenje sedimenta s plovila (**Slika 6**) (MBP Piran, 2006) z ladje BP PI800 SAGITA odvzeli 3 sredice. Material smo po odvzemu skupaj s hladilnimi ploščami hranili v škatlah, do obdelave pa pri 4°C.



Slika 5: Območje vzorčenja za pridobitev morskih sedimentnih vzorcev



Slika 6. Gravitacijski korer za vzorčenje sedimenta s plovila (Morska biološka postaja Piran, 2006)

3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE ČISTIH KULTUR

3.2.1 Sladkovodni sediment

Za izolacijo mikroorganizmov iz sedimenta Koseškega bajerja smo uporabili aerobna agarizirana gojišča po Lurii in Bertaniju (LB), minimalno gojišče s solmi M9 in glukozo (M9+Glc). Sestava in priprava gojišč sta prikazani v podpoglavju 3.9.1.

Iz vsake sredice smo odrezali eno rezino 1 cm pod površino sedimenta, iz sredice 1 pa tudi 5 cm in 10 cm pod površino sedimenta. Do pet gramov materiala iz vsake rezine smo prenesli v sterilne 50-mililitrske plastične centrifugirke (TPP, Švica) in ga resuspendirali v 33 ml sterilne fiziološke raztopine. Centrifugirke smo sonicirali (sonična kopel Sonis, Iskra, Slovenija) 5 min ter pustili, da se grobi delci posedejo. Desetiško redčitveno vrsto (do 10^{-4}) smo pripravili tako, da smo 0,5 ml predhodne redčitve prenesli v 4,5 ml fiziološke raztopine, prvi inokulum pa je bila suspenzija nad usedlino. 100 μ l vsake redčitve smo razmazali na plošče LB ali M9+Glc (glej 3.9.1) v petrijevkah (15-20 ml gojišča). Plošče smo inkubirali v temi v aerobnih pogojih pri sobni temperaturi ter jih pregledovali vsakih 7 dni. Poljubno izbrane, makromorfološko zanimive zrasle kolonije smo popisali in precepili na istovrstno gojišče.

Makromorfološko čistost smo preverjali s pregledovanjem plošč in medsebojnim primerjanjem kolonij. Mikromorfološko čistost smo preverjali z barvanjem po Gramu ter opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom (Olympus CH-2). Čiste kulture smo shranjevali s subkultiviranjem in jih precepljali na 14-30 dni.

3.2.2 Morski sediment

Za izolacijo mikroorganizmov iz morskih sedimentov smo uporabili šest različnih oligotrofnih agariziranih gojišč. Prvi tip gojišč je temeljil na morski vodi (SW, *angl.* seawater), drugi tip pa

na modificiranem gojišču z umetno morskno vodo (ASW, *angl.* artificial seawater) (Köpke in sod., 2005). V dveh primerih smo osnovnemu gojišču pred sterilizacijo dodali 0,2 g/l glukoze (SW+Glc in ASW+Glc), v dveh pa 0,2 g/l kazeina (SW+Kaz in ASW+Kaz). Sestava izvirnih in modificiranih gojišč, ki so temeljila na umetni morski vodi (ASW, ASW+Kaz, ASW+Glc), ter gojišč, ki so temeljila na morski vodi, je prikazana v podpoglavju 3.9.

Iz blata, materiala z dna in sredic smo vzorce odvzeli v aerobnih razmerah pri sobni temperaturi. Vzorce smo pripravili tako, da smo v sterilno plastično centrifugirko (15 ml; sterilizirane z γ -žarki; TPP, Švica) aseptično prenesli med 7,00 g in 11,00 g materiala, dodali 5 ml z avtoklaviranjem (121°C, 1,1 bar, 15 min) sterilizirane morske vode (SW; odvzeta v 10-litrsko plastično (PEHD) posodo v Fažani, 22. oktobra 2004), premešali na mešalu in pustili, da se grobi delci samodejno posedejo. Preglednica prikazuje maso materiala pri posameznem vzorcu. Za gojenje mikroorganizmov smo uporabili suspenzijo in posedeni material. Za desetiško redčitveno vrsto (do 10^{-5}) smo 1 ml suspenzije nad posedenim materialom prenesli v 9 ml SW. Za višjo redčitev smo 1 ml predhodne redčitve prenesli v 9 ml SW in premešali na mešalu.

Preglednica 3: Količina materiala, uporabljena pri pripravi vzorcev

<u>Vzorec</u>	<u>Masa [g]</u>
V1	10,00
V2	9,49
V3	10,48
V4	8,31
V5	7,15
V6	7,17

V1...blato z dna Strunjanskega potoka; V2...material z dna ob Strunjanskem pomolu; V3...zgornji sloj sredice 1; V4...srednji sloj sredice 1; V5...spodnji sloj sredice 1; V6...zgornji sloj sredice 2

Na agarizirana gojišča v petrijevkah (15-20 ml gojišča) smo nacepili 100 μ l suspenzije, vsake stopnje v redčitveni vrsti ali posedenega materiala. Plošče smo inkubirali v temi, pri sobni temperaturi, v aerobnih pogojih in jih pregledovali vsakih 7 dni. Kolonije smo precepili na

istovrstna gojišča; izbrane kolonije so kazale agarolitično aktivnost, bile makromorfološko zanimive ali oboje. Kulture smo precepljali na 21-45 dni.

3.3 FENOTIPSKI TESTI

3.3.1 Makromorfološki opis

Opazovali smo obliko, rob, površino, profil, teksturo in pigmentiranost kolonije ter izmerili premer.

3.3.2 Barvanje po Gramu

Posušen in nad plamenom plinskega gorilnika fiksiran razmaz kulture smo 1 min barvali kristalno vijoličnim. Barvilo smo sprali z rahlim curkom vodovodne vode. Preparat smo prelili z lugolom, odlili in ponovno prelili z lugolom. Pustili smo 1 min, sprali z rahlim curkom vodovodne vode in nato z mešanico etanola in acetona. Po ponovnem spiranju z vodovodno vodo smo preparat odcedili in prelili s safraninom. Barvali smo 1 min, nato sprali z vodovodno vodo in posušili. Preparat smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi (imerzijski objektiv).

3.3.3 Barvanje endospor po Schaeffer in Fultonu (Schaeffer in Fulton, 1933; Mormak in Cassida, 1985)

Posušen in nad plamenom plinskega gorilnika fiksiran razmaz kulture smo prelili z malahitzelenim in 1 min segrevali nad plamenom sveče, da je barvilo počasi izhlapevalo. Nato smo preparat temeljito sprali pod rahlim curkom vodovodne vode in odcedili. Sledilo je 30-sekundno barvanje s safraninom. Nato smo preparat sprali z vodovodno vodo in posušili. Preparat smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi (imerzijski objektiv).

3.3.4 Test s 3-odstotnim kalijevim hidroksidom (KOH)

Objektno steklo (76 mm × 26 mm × 1 mm; Marienfeld, Nemčija) smo trikrat hitro potegnili skozi plamen plinskega gorilnika. Ko se je ohladilo, smo na sredino stekelca kanili kapljico 3-odstotne vodne raztopine KOH in vanjo s sterilno plastično cepilno zanko (1 µl; Brand) vmešali aseptično odvzeto kulturo s plošče. Med rahlim mešanjem smo opazovali spremembo viskoznosti suspenzije. Če nismo zaznali sprememb, smo test zaključili po 30 s (Buck (1982) priporoča 60 s). Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno plastično cepilno zanko brez mikrobne kulture.

3.3.5 Katalazni test

V vdolbino sterilne mikrotitrne plošče (8×12, 330 µl; PS; sterilizirane z γ-žarki, Brand) smo kanili 20 µl vodikovega peroksida (H₂O₂; Merck) in s sterilno plastično cepilno zanko dodali mikrobno kulturo s plošče. Pazili smo, da se pri prenašanju kulture nismo dotaknili gojišča. Opazovali smo pojavljanje mehurčkov v suspenziji mikrobne kulture v H₂O₂. Kot negativno kontrolo smo uporabili sterilno plastično cepilno zanko brez mikrobne kulture.

3.4 IZOLACIJA DNK Z METODO PO AUSUBLU

Izhodiščni material je bila kultura, ki je zrasla na trdnem gojišču. Kulturo smo s sterilno plastično cepilno zanko postrgali s plošče in resuspendirali v 567 µl pufra TE (pH 8.0). Dodali smo 3 µl proteinaze K in 30 µl 10 % SDS. Po enurni inkubaciji v vodni kopeli pri 37°C smo najprej dodali 100 µl 5 M NaCl in nato 80 µl CTAB/NaCl, ogretega na 65 °C. Po desetminutni inkubaciji pri 65 °C smo dodali 780 µl kloroforma (Merck) in centrifugirali 5 min pri 12000×g in sobni temperaturi. Vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in hkrati izmerili njen volumen. Dodali smo enako prostornino mešanice fenol:kloroform:izoamilalkohol (FKI) (Sigma Aldrich) v razmerju 24:25:1 (v/v/v) ter zaprto mikrocentrifugirko nekajkrat nežno obrnili. Po ponovnem centrifugiranju (12000×g, 5 min, sobna temperatura) smo supernatant

ob hkratnem izmerjenju volumna (V_{sn}) prenesli v drugo mikrocentrifugirko in dodali $0,6V_{sn}$ hladnega (4°C) 2-propanola (Merck). Mikrocentrifugirko smo nekajkrat nežno obrnili. Po centrifugiranju (14000 g, 10 min, 4°C) in odstranitvi supernatanta smo usedlino dvakrat očistili s 500 μl ledenomrzlega 70-odstotnega EtOH (Merck) in enkrat s 500 μl ledenomrzlega absolutnega EtOH (Merck). Ves absolutni EtOH smo odstranili, usedlino osušili in resuspendirali v 50 μl 1 mM Tris (pH 8,0). Izolirano DNK smo do nadaljne uporabe shranili pri -20°C . Uspešnost izolacije smo preverili s horizontalno agarozno gelsko elektroforezo.

3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200-mikrolitrskih mikrocentrifugirkah (Brand). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov; $1\times$ PCR-pufer (Fermentas Life Sciences); 0,25 μM začetnega oligonukleotida v 3' smeri kodirajoče verige (fD1 ali eub338; Microsynth) in 0,25 μM začetnega oligonukleotida v 5' smeri kodirajoče verige (1392r ali 1401r; Microsynth); 0,03 U/ μl rekombinantne DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (TaqPol) (5 U/ μl ; Fermentas Life Sciences), 1 μl matrične DNK v 1 mM Tris (pH 8,0) ter 12,28 μl vode Sigma H_2O (Sigma Aldrich). Podatki o začetnih oligonukleotidih so prikazani v **Preglednici 4**. Pomnoževanje je potekalo v sistemih za toplotno pomnoževanje (nukleinskih kislin) MyCycler thermal cycler (BioRad Laboratories, Hercule, ZDA). Program PCR je prikazan v **Preglednici 5**. Prisotnost produkta smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu v $0,5\times$ TBE.

3.6 HORIZONTALNA AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

3.6.1 Agarozna gelska elektroforeza izolirane genomske DNK

Uspešnost izolacije genomske DNK smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo v 0,8-odstotnih minigelih. 0,32 g agaroze (SeaKem[®] LE Agarose, Cambrex BioScience,

Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi

Tip ZO ¹	Sistematično ime ²	Druška poimenovanja	Zaporedje (5'→3')	Dolžina [nt]	Tarčno zaporedje (<i>E. coli</i> 16S rRNA)	Specifičnost	Vir
F	S-D-Bact-0008-a-A-20	fD1, Bact0011-f, 8f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	8...27	<i>Bacteria</i> ³	Weisburg in sod., 1991; Ben-Amor in sod., 2005; Tamaki in sod., 2005
	S-D-Bact-0338-a-A-18	Eub338f	GCTGCCTCCGTTAGGAGT	18	338...355	<i>Bacteria</i>	Amman in sod., 1995
R	S-*Univ-1392-a/b-A-15	1392r, RU	ACGGGCGGTGTGT(A/G)C	15	1392...1406	Univerzalni	Matsuki in sod., 2002
	S-D-Bact-1401-a-A-17	1401r	GCGTGTGTACAAGACCC	17	1401...1417	<i>Bacteria</i>	Nübel in sod., 1996 ⁴ ; Zhu in sod., 2002; Ben-Amor in sod., 2005

¹ZO...začetni oligonukleotid

F...začetni oligonukleotid v smeri 5'-3' kodirajoče verige

R...začetni oligonukleotid v smeri 3'-5' kodirajoče verige

²Sistematično ime prirejeno po Wheeler Alm in sod., 1996³Gich in sod. (2005) kot tarčno skupino za 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') navajajo *Planctomyces*⁴Nübel in sod. (1996) so v izvorniku uporabili R-1401 (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3')**Preglednica 5:** Program PCR

Oznaka	T [°C]	t [min]	Št. ciklov
Predcikel - HotStart	95	3,0	1
Denaturacija	95	0,5	
Prileganje ZO ¹	56	0,5	25
Podaljševanje	72	1½	
Post ²	72	12,0	1
Vzdrževanje	4	∞	1

Pri izolatih SWG 1 in SWK 15 je poteklo 35 ciklov denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja.

¹ZO... začetni oligonukleotid(i)²Podaljšana polimerizacija

Rockland, Inc., Rockland, Maine, ZDA) smo s segrevanjem v mikrovalovni pečici (800 W; Sharp) raztopili v 40 ml 0,5× Tris-boratnega pufra (0,5× TBE) in vlili v vpet nosilec za gel z vstavljenim glavnikom. Ko se je agarozna mešanica pri sobni temperaturi ohladila in polimerizirala, smo glavnik odstranili, gel pa prestavili v banjico (MiniSub[®] Cell GT, BioRad Laboratories, Hercule, ZDA) z elektroforetskim pufrom (0,5× TBE). Mešanico vzorca in nanašalnega pufra (0,25 % bromofenolmodro v 40 % vodni raztopini saharoze) v razmerju 1:6 smo vnesli v jamice gela. Ob vzorcih smo na vsak gel nanegli velikostni standard, t.j. 1 kb lestvico (10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4500 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp in 250 bp; Fermentas Life Sciences). Elektroforeza je tekla 60 min pri napetosti 5 V/cm in toku 400 mA, v anodni smeri. Označevanje DNK v gelu po elektroforezi je potekalo v raztopini etidijevega bromida (EtBr) v destilirani vodi. Barvanje je trajalo 5-15 min, razbarvanje v destilirani vodi pa dvakrat dlje. Po barvanju z EtBr smo DNK v gelu odkrivali z vzbujanjem pri valovni dolžini 254 nm in sliko dokumentirali s sistemom GelDoc (BioRad Laboratories, Hercule, ZDA). Fotografije smo obdelali s programoma Molecular Analyst Software (BioRad Laboratories, Hercule, ZDA) in Microsoft PhotoEditor.

3.6.2 Agarozna gelska elektroforeza produktov verižne reakcije s polimerazo

Prisotnost, velikost in količino produkta verižne reakcije s polimerazo smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo v 1-odstotnem agaroznem gelu v 0,5× TBE. Za pripravo gela smo uporabili 1,0 g agaroze (SeaKem[®] LE Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, Maine, ZDA) in 100 ml 0,5× Tris-boratnega pufra (0,5× TBE). Nadaljnji potek je bil enak, kot je opisan v 3.6.1.

3.7 VIRTUALNI PCR IN VIRTUALNA RESTRIKCIJSKA ANALIZA

3.7.1 Nabor zaporedij

770 sekvenc genov za 16S rRNK smo naložili v obliki dveh datotek v formatih FASTA (.fa) in GenBank (.gen) s spletne strani Ribosomal Database Project II, Release 9 (Cole in sod., 2005) (RDP II.9). Nabor sekvenc je bil rezultat iskanja z iskalnim nizom *freshwater sediment* in orodjem Hierarchy Browser v zbirki sekvenc 16S rDNK, daljših in krajših od 1200 bp, tipskih in netipskih ter gojenih in negojenih mikrobnih sevov, prikazanih v obliki hierarhične razporeditve, kot jo predlaga Bergeyev priročnik za sistematsko bakteriologijo. Iskanje je zajelo sekvence, ki so bile v bazi podatkov 10. aprila 2006; na ta dan je baza obsegala 84155 sekvenc. Iskanje z enakim iskalnim nizom in iskalnimi parametri (krajše in daljše od 1200 bp, tipski in netipski sevi, gojeni in negojeni sevi, hierarhična razporeditev po Bergeyevem priročniku za sistematsko bakteriologijo) 20. avgusta 2006 (baza je obsegala 253813 sekvenc, nazadnje je bila posodobljena 28. julija 2006) je vrnila 791 zadetkov, vseh iz domene Bacteria (kot je uporabljena v kontekstu strani RDP II 9.41).

3.7.2 Virtualni PCR in obdelava zaporedij za virtualno restriksijsko analizo

Za iskanje domnevnih PCR-produktov (*in silico* PCR, virtualni PCR, itn.) smo uporabili program FastPCR (Kalendar, 2006). Par začetnih oligonukleotidov sta sestavljali zaporedji fD1 in 1401r ([Preglednica 4](#)). V zadnjih 7 nukleotidih (nt) na 3'-koncu smo dopustili 2 neujemanji (možen razpon: 0...5 nt), prag (*angl.* local alignment similarity) je bil 80 % (možen razpon 55...100 %). Analizo smo omejili na par začetnih oligonukleotidov (*angl.* restrict analysis to F/R primer pairs). Rezultati so bili podani v obliki besedilne datoteke; primeri izpisov rezultatov so na **Sliki 7**.

New Sequence

>s000435985 achromatium oxaliferum (t); purified from freshwater sediment, rydal, cumbria, uk; 5; l42543

>olig1f

5'-agagtttgatcctggctcag

>

Find at site: 5'-agagtttgatcctggctcag

Position: 1 -> 21

agagtttgatcctggctcag->

||||||||||||||

agagtttgatcctggctcag

Tm dimer=59,3°C Similarity=100%

>olig1r

5'-gcgtgtgtacaagaccc

>

Find at site: 5'-gggcctgtacacaccg

Position: 1368 <= 1388

<=cccagaacatgtgtgcg

||| ||||||||

cccggaacatgtgtggc

Tm dimer=40,1°C Similarity=82%

```
In silico PCR (PCR product prediction) for: >s000435985 achromatium oxaliferum (t); purified from freshwater sediment, rydal, cumbria, uk; 5; l42543

>olig1f_1->21 Tm dimer=59,3°C Similarity=100%
5'-agagtttgatcctggctcag

>olig1r_1386<= 1388 Tm dimer=40,1°C Similarity=82%
5'-gcgtgtgtacaagaccc

PCR product size: 1385bp
```

Slika 7: Izpis rezultatov iskanja domnevnih PCR-pomnožkov pri danih zaporedjih nukleinskih kislin in para začetnih oligonukleotidov (olig1f...fD1, olig1r...1401r) z virtualnim PCR v programu FastPCR (Kalendar, 2006). Sekvenca ima tarčno zaporedje za oba začetna oligonukleotida. Med reverznim začetnim oligonukleotidom in njegovim tarčni zaporedjem so 3 neujemanja. Domnevni pomnožek je dolg 1385 bp.

Pred virtualno restrikcijsko analizo smo sekvence obdelali:

- Sekvence brez tarčnih zaporedij smo izločili
- Sekvence s tarčnim zaporedjem za začetni oligonukleotid v 3' smeri kodirajoče verige so ostale nespremenjene, če je bil prvi nukleotid na 5'-koncu tarčnega zaporedja tudi prvi nukleotid celotne sekvence (**Slika 7**) ali če je bilo tarčno zaporedje na 5'-koncu krajše od začetnega oligonukleotida
- Sekvence s tarčnim zaporedjem za začetni oligonukleotid začetni oligonukleotid v 3' smeri kodirajoče verige smo skrajšali za ustrezno število nukleotidov na 5'-koncu, če prvi nukleotid na 5'-koncu tarčnega zaporedja ni bil tudi prvi nukleotid celotne sekvence
- Sekvence s tarčnim zaporedjem za oligonukleotid v 5' smeri kodirajoče verige (reverzni oligonukleotid) so ostale nespremenjene, če je bil zadnji nukleotid na 3'-koncu reverznega komplementa reverznega oligonukleotida tudi zadnji nukleotid na 3'-koncu sekvence
- Sekvence s tarčnim zaporedjem za reverzni oligonukleotid smo skrajšali za ustrezno število nukleotidov na 3'-koncu, če zadnji nukleotid na 3'-koncu reverznega

komplementa reverznega oligonukleotida ni bil tudi zadnji nukleotid na 3'-koncu sekvence

- Sekvence s tarčnima zaporedjema za oba začetna oligonukleotida (**Slika 7**) smo spremenili, kot je opisano od druge do četrte alineje, da je ostala regija med prvim nukleotidom na 5'-koncu tarčnega zaporedja začetnega oligonukleotida v 3' smeri tarčne verige in zadnjim nukleotidom na 3'-koncu reverznega komplementa reverznega začetnega oligonukleotida.

3.7.3 Virtualna restrikcijska analiza

Virtualno restrikcijsko analizo (restrikcije *in silico*) smo opravili s programom CLC Free Workbench 2.5.1 (CLC bio A/S, 2006). Značilnosti uporabljenih restrikcijski encimov so prikazane v **Preglednici 6**.

Preglednica 6: Uporabljene restriktaze, organizmi, od koder so bile izolirane, prepoznavna zaporedja in restrikcijska mesta ter tip koncev, ki nastanejo po restrikciji (W=A, T)

Restrikcijski encim	Vir	Prepoznavno zaporedje (5'→3')	Mesto restrikcije	Tip koncev
<i>AvaII</i>	<i>Anabaena variabilis</i>	GGWCC	G GWCC	5'-ostri
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GGCC	GG CC	topi
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCGC	GCG C	3'-ostri
<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	GATC	GATC	5'-ostri

Rezultate restrikcij *in silico*, podane v obliki tabel, ki prikazujejo število in pozicije restrikcijskih mest za vsak encim pri vseh sekvencah, smo prenesli v skupne preglednice glede na tip PCR-pomnožka:

- fD1, če je imela sekvenca tarčno mesto le za začetni oligonukleotid v 3' smeri kodirajoče verige
- 1401r, če je imela sekvenca tarčno mesto le za reverzni začetni oligonukleotid
- fD1/1401r, če je imela sekvenca tarčni mesti za oba začetna oligonukleotida

Profile restrikcijskih mest posamičnih *in silico* restrikcij (*AvaII*; *HaeIII*; *HhaI*; *Sau3AI*) smo združevali v profile restrikcijskih mest dvojnih (*AvaII* + *HaeIII*; *AvaII* + *HhaI*; *AvaII* + *Sau3AI*; *HaeIII* + *HhaI*; *HaeIII* + *Sau3AI*; *HhaI* + *Sau3AI*), trojnih (*AvaII* + *HaeIII* + *HhaI*; *AvaII* + *HaeIII* + *Sau3AI*; *AvaII* + *HhaI* + *Sau3AI*; *HaeIII* + *HhaI* + *Sau3AI*) in četvernih (*AvaII* + *HaeIII* + *HhaI* + *Sau3AI*) restrikcij.

Za vsako od kombinacij restriktaz smo ugotovili število edinstvenih (EP), needinstvenih (NP) in ničelnih profilov (NiP) restrikcijskih mest ter skupno število različnih profilov restrikcijskih mest, ki je vsota števila EP in NP. Ugotovili smo število in izračunali odstotek sekvenc med zadetki, ki imajo tarčno zaporedje za vsaj enega od obeh začetnih oligonukleotidov.

3.8 RESTRIKCIJSKA ANALIZA POMNOŽENE RIBOSOMSKE DNK (*angl.* amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)

3.8.1 Dvojne restrikcije PCR-pomnožkov

Produkte pomnoževanja 16S rDNK s PCR in parom začetnih oligonukleotidov fD1/1401r (fD1/1401r-PCR) smo hkrati razrezali z dvema restrikcijskima endonukleazama, *BsuRI* (GG/CC; izoshizomera *HaeIII*) in *HhaI* (GCG/C) (Fermentas Life Sciences, 2006; 10 U/ μ l)). Reakcijske mešanice za dvojne restrikcije smo pripravili po priporočilu proizvajalca (DoubleDigestTM Engine, Fermentas Life Sciences, 2006).

Reakcijske mešanice za restrikcije PCR-pomnožkov izolatov iz sladkovodnega oz. morskega sedimenta smo pripravili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah (Eppendorf) oz. 200 μ l mikrocentrifugirkah za PCR (Brand). Mešanice smo pripravili tako, da smo zmešali 12 U *HhaI*, 24 U *BsuRI*, 3,3 μ l 10x Tango[®] (vse Fermentas Life Sciences), 15 μ l neočiščenega PCR-produkta in 26,4 μ l sterilne MilliQ (MQ) (MilliPore, ZDA) za morske izolate ter 20 μ l neočiščenega PCR-produkta in 21,4 μ l sterilne MQ za sladkovodne izolate.

Pokrovčke mikrocentrifugirk smo oblepili z zaščitnim filmom (Parafilm[®] M, Structure Probe, Inc/SPI Supplies, Pennsylvania, ZDA). Restriksijske mešanice smo inkubirali 3 h v vodni kopeli pri 37°C. Reakcije smo ustavili z dodatkom 0,966 µl 0,5 M EDTA (končna koncentracija 10 mM), ki mu je sledila 20-minutna inkubacija pri 80°C (termoblok; CH-100, Biosan). Pred analizo z Agilent 2100 bioanalyzerjem smo produkte restrikcij očistili z etanolno precipitacijo (glej dalje).

3.8.2 Čiščenje produktov restrikcij z etanolno precipitacijo (Sambrook in Russell, 2001).

Po končani inkubaciji smo vsaki restriksijski mešanici dodali 2,05 µl 5 M NaCl, rahlo premešali s pipetnim nastavkom (Brand) ter kratek čas centrifugirali v namizni centrifugi (miniSpin plus, Eppendorf) pri sobni temperaturi. Dodali smo dvakratni volumen (102,6 µl) ledenega absolutnega etanola (Merck) in mešanice/raztopine za 1 h shranili pri temperaturi -20°C. Nato smo jih 15 min centrifugirali pri 15000 g in temperaturi 2°C (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen). Po centrifugiranju smo supernatant previdno odstranili, preostali etanol pa pustili izhlapeti pri sobni temperaturi. Osušene pelete smo resuspendirali v 5 µl 1 mM Tris (pH 8,0) in do analize shranili pri -20°C.

3.8.3 Analiza produktov restrikcij z Agilent 2100 bioanalyzerjem

Čipe za ločevanje dsDNK v velikostnem območju 25-1000 bp (Agilent DNK 1000 Series II Kit) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, ZDA) ter analizirali s sistemom Agilent 2100 bioanalyzer in programom Agilent 2100 expert (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, ZDA).

3.8.4 Obdelava restriksijskih profilov

Po analizi s programom Agilent 2100 expert smo podatke o edinstvenih dolžinah restriksijskih fragmentov ter izolatov, pri katerih se pojavljajo, vnesli v pravokotno matriko velikosti $i_0 \times j_0$. i_0

je število vrstic oziroma edinstvenih dolžin restrikcijskih fragmentov, j_0 pa število stolpcev oziroma izolatov prvotne matrike. Iz podatkov o dolžini in molarni koncentraciji nekaterih fragmentov smo posumili na nepopolne restrikcije, mešane vzorce ali kontaminacijo. Prvotno matriko smo tako s prilagoditvijo izbora izolatov in fragmentov spremenili v matriko velikosti $i_1 \times j_1$. Prisotnost fragmenta dolžine i pri sevu j je bila označena z 1, odsotnost pa z 0; podatke smo torej obravnavali kot kvalitativne. Za obdelavo podatkov s programskim paketom NTSYS-pc v1.8 (Exeter Software, 1993; Rohlf, 1993) je bila v Excelu izdelana preglednica pretvorjena v besedilno datoteko, *.txt. Za izris filogenetskega drevesa smo v NTSYS-pc v1.8 (Exeter Software, 1993; Rohlf, 1993) uporabili naslednje zaporedje operacij:

1. Z ukazom OUTPUT smo preverili, ali datotečni format ustreza zahtevam NTSYS-pc v1.8. Ukaz OUTPUT tudi oblikuje matriko tako, da je primerna za tiskanje in obdelavo s programi za oblikovanje besedil.
2. Z algoritmom SIMQUAL smo izračunali tri asociacijske koeficiente – preprostega (*simple matching*, SM), Jaccardovega (J) in Diceovega (D) (Rohlf, 1993):

$$SM = (a+d)/(a+b+c+d)$$

$$J = d/(b+c+d)$$

$$D = 2d/(2d+b+c),$$

kjer je a število parov 0-0, b število parov 0-1, c število parov 1-0, d število parov 1-1; m je število "ujemanj" ($m = a + d$), n pa število "neujemanj" ($n = b + c$).

3. SAHN clustering (*angl.* sequential, agglomerative, hierarchical, nested (clustering methods); Sneath in Sokal, 1973; cit po Rohlf, 1993) je algoritem, ki v zaporednih medsebojnih primerjavah parov (i,j) objektov matrike išče in v skupke združuje najpodobnejše ter podobnost (oziroma različnost) kvantitativno ovrednoti. Za združevanje objektov v programu SAHN smo uporabili netehtano aritmetično sredino parnih skupin (*angl.* unweighted pair-group method, arithmetic mean, UPGMA), to je netehtano aritmetično sredino vrednosti uporabljenih asociacijskih koeficientov (glej zgoraj). Rezultat je bil podan v obliki matrike podobnosti in fenograma.

3.9 GOJIŠČA, RAZTOPINE, PUFRI, ENCIMI

3.9.1 Gojišča

Trdno gojišče po Lurii in Bertaniju (LB) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Difco) 40 g sestavin v prahu smo raztopili v 1 l destilirane vode, med nenehnim mešanjem z magnetnim mešalom segreli do vretja in sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121°C, nadtlak 1,1 bar). Po 15-25 ml gojišča smo alikvotirali v sterilne petrijevke.

Za pripravo 1 l trdnega minimalnega gojišča s solmi M9 in glukozo (M9+Glc) smo posebej pripravili agarizirano vodo (750 ml destilirane vode in 15 g bakteriološkega agarja (Biolife S.r.l., Italija), 1 M MgSO_4 , 1 M CaCl_2 in 5× M9 (pripravljeno po navodilih proizvajalca; Difco Laboratories, ZDA) ter jih sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121°C, nadtlak 1,1 bar). 20,0-odstotna (w/v) raztopina glukoze je bila pripravljena tako, da smo raztopili 20,0 g glukoze (Merck) v destilirani vodi in dopolnili do 100 ml. Raztopino smo filtrsko sterilizirali – uporabili smo membranski filter s premerom por 0,22 μm (Millex, Millipore, ZDA). Avtoklavirani vodi z agarjem, ohlajeni na 50°C ali manj, smo najprej dodali 200 ml 5× M9, nato 2 ml 1 M MgSO_4 , 20 ml 20 % Glc, 100 μl 1 M CaCl_2 in po potrebi dopolnili do 1 l s sterilizirano destilirano vodo. Po 15-25 ml gojišča smo alikvotirali v sterilne petrijevke.

Sestavo izvirnega osnovnega gojišča, ki temelji na umetni morski vodi, prikazuje **Preglednica 7** na naslednji strani; v opombi pod preglednico so navedene razlike med izvirnim in modificiranim (ASW) osnovnim gojiščem, ki smo ga uporabili v tej nalogi. Za pripravo gojišč z glukozo (ASW+Glc) smo osnovnemu gojišču pred sterilizacijo dodali 0,2 g/l glukoze. Za pripravo gojišč s kazeinom pa 0,2 g/l kazeina. V vseh primerih smo dodali še 1,5 ut. % bakteriološkega agarja (Biolife S.r.l, Italija). Sestavine smo raztopili v destilirani vodi (do 970 ml) in sterilizirali z avtoklaviranjem (121°C, 15 min, nadtlak 1,1 bar). Ohlajenemu

(približno 50°C) gojišču smo dodali filtrsko (0,22 µm; Millex, Millipore, ZDA) steriliziran 1 M NaHCO₃ (30 ml/l). Po 15-25 ml gojišča smo alikvotirali v petrijevke.

Preglednica 7: Sestava gojišč, ki so temeljila na umetni morski vodi (ASW)

Sestavina	Koncentracija [g/l]
NaCl (Merck)	24,3
MgCl ₂ ×6H ₂ O	10,0
CaCl ₂ ×2H ₂ O (Merck)	1,5
KCl (Merck)	0,66
Na ₂ SO ₄ (Merck)	4,0
KBr *	0,1
H ₃ BO ₃ (Merck)	0,025
SrCl ₂ ×6H ₂ O *	0,040
NH ₄ Cl (Kemika)	0,021
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,0054
NaF *	0,003

* Naše gojišče ni vsebovalo KBr, SrCl₂×6H₂O in NaF.

Osnova gojišč, ki so temeljila na morski vodi (*seawater*; SW, SW+Glc, SW+Kaz), je bila z avtoklaviranjem (121°C, 15 min, nadtlak 1,1 bar) sterilizirana morska voda. Za pripravo gojišč z glukozo (SW+Glc) smo morski vodi pred sterilizacijo dodali 0,2 g/l glukoze. Za pripravo gojišč s kazeinom smo morski vodi pred sterilizacijo dodali 0,2 g/l kazeina. V vseh primerih smo dodali še 1,5 ut. % bakteriološkega agarja (Biolife S.r.l., Italija).

3.9.2 Raztopine, pufri, encimi

3.9.2.1 Barvanje po Gramu

Delovna raztopina **kristalvijoličnega** vsebuje 20 ml raztopine A in 80 ml raztopine B.

Raztopina A (10 % (w/v) kristalvijolično v 95 % (v/v) etanolu): 10 g kristalvijoličnega (Merck) smo raztopili v 100 ml 95 % (v/v) etanola (Merck)

Raztopina B (0,01 % (w/v) vodna raztopina amonijevega oksalata): 0,8 g amonijevega oksalata, $(\text{NH}_4)_2(\text{COO})_2$ (Riedel de Haën AG, Seelze Hannover) smo raztopili v 80 ml destilirane vode

Lugol: 5 g I_2 , 10 g KI (oboje Kemika, Zagreb, Hrvaška) ter 100 ml destilirane vode

Etanol/aceton v razmerju 1:9: 10 % (v/v) acetona (Merck), 90 % (v/v) absolutnega etanola (Merck)

Safranin (Safranin O, Merck): 0,25 % (w/v) v vodi

3.9.2.2 Barvanje endospor po Schaeffer in Fultonu

Malahitno zelenilo (5 % vodna raztopina malahitnega zelenila): 5 g malahitnega zelenila (Kemika, Zagreb, Hrvaška) smo raztopili v 100 ml destilirane vode, pustili stati 1 h in filtrirali.

3.9.3 KEMIČALIJE IN PUFRI ZA IZOLACIJO DNK

10× Tris EDTA (TE) pH 8,0 (Sambrook in Russell, 2001)

100 mM Tris-Cl (pH 8,0)

10 mM EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina) (pH 8,0) (Sigma Aldrich)

1 M Tris-Cl pH 8,0 (Sambrook in Russell, 2001)

121,1 g Tris baze (Tris(hidroksimetil)-aminometan) (Merck)

800 ml H_2O

pH uravnamo z dodatkom 42 ml koncentrirane HCl in dopolnimo s H_2O do 1000 ml

10 % SDS: 10 % (w/v) natrijev dodecilsulfat v vodi; motna raztopina se zbistri med inkubacijo pri 37 °C

CTAB/NaCl: 10 % (w/v) heksadeciltrimetilamonijev bromid (Fluka); 0,7 M NaCl

10 g CTAB

4,09 g NaCl (Merck)

destilirana voda do 100 ml

5 M NaCl: 292,9 g NaCl (Merck) smo raztopili v 800 ml destilirane vode, dopolnili do 1000 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem

3.9.4 HORIZONTALNA AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA

0,5× TBE (0,5-kratni Tris-boratni pufer):

100 ml 5× TBE

900 ml destilirane vode

5× TBE

54 g Tris baze (Merck)

27,5 g H₃BO₃ (Merck)

20 ml 0,5 M EDTA (Merck)

destilirana voda do 1000 ml

Nanašalni pufer tip IV (Sambrook in Russell, 2001)

0,25 % (w/v) bromofenolmodro

40 % (w/v) saharoza

Etidijev bromid (EtBr)

Delovno raztopino EtBr (50 µl/500 ml oz. 0,05 µg/500 ml) smo pripravili iz založne raztopine (1 µg/ml) in destilirane vode.

3.9.5 KEMIČALIJE IN PUFRI, KI SMO JIH UPORABILI V RESTRIKCIJSKI ANALIZI POMNOŽENE RIBOSOMSKE DNK (ARDRA)

Restriksijska endonukleaza **BsuRI**

10 U/μl; shranjena v 10mM Tris-HCl (pH 7.5 pri 25°C), 50mM KCl, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.2mg/ml BSA in 50% glicerolu; Fermentas Life Sciences, 2006

Restriksijska endonukleaza **HhaI**

10 U/μl; shranjena v 10mM Tris-HCl (pH 7,4 pri 25°C), 100mM KCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.2mg/ml BSA in 50% glicerolu; Fermentas Life Sciences, 2006

10× Buffer Tango™

33 mM Tris-acetat (pH 7,9 pri 37°C); 10 mM Mg-acetat; 66 mM K-acetat; 0,1 mg/ml BSA; Fermentas Life Sciences, 2006

0,5 M EDTA pH 8,0

179,1 g trinatrijeve soli EDTA (Sigma Aldrich)

Destilirana voda do 1000 ml

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA IN GOJENJE ČISTIH KULTUR

4.1.1 Sladkovodni sediment

Preglednica 8 je seznam aerobnih heterotrofnih izolatov iz sedimentov Koseškega bajerja ter makromorfološki opis domnevno čistih kultur.

Preglednica 8: Aerobni heterotrofni izolati iz sedimentov Koseškega bajerja ter makromorfološki opis domnevno čistih kultur (PK...posamična kolonija). **Preglednica 8** se nadaljuje na naslednji strani.

	Izolat	Gojišče	Makromorfološki opis
1	BD1(22)	LB	Rumena, nesvetleča, kompaktna, neprosojna, valovit rob
2	BD2(22)	LB	Rumena, nesvetleča, kompaktna, neprosojna, valovit rob

3	BD3(22)	LB	Bela/krem, svetleča, neprosojna, ploščata, nazobčan rob
4	BD4(22)	LB	Ploščata, svetleča, rob ni gladek, koncentrična rast
5	BO3(22)	LB	Rumena, svetleča, ploščata, okrogla
6	KJ1(22)	LB	Rahlo privzdignjena, prosojna, gladek rob, obarvana, PK nepravilne oblike
7	KJ3(22)	LB	Svetlorumena, neprosojna, okrogla, ploščata, valovit rob
8	KJ4(22)	LB	Bela, okrogla, svetleča, nitast rob
9	MR1(22)	LB	Svetlorumena, neprosojna, okrogla, privzdignjena, svetleča
10	MR2(22)	LB	Svetlorumena, okrogla, privzdignjena, svetleča
11	MR3(22)	LB	Rumena, zbita, neprivzdignjena, mazava
12	MR4(22)	LB	Rumena, gladek rob, privzdignjena, svetleča
13	NS1(22)	LB	Rožnata, svetleča, privzdignjena, gladek rob
14	NS2(22)	LB	Krem, ploščata, neprosojna, nagubana, nitast/nazobčan rob
15	OB1(22)	LB	Krem, z belim poprhom, rumen reverz, trda; vonj po zemlji
16	OB2(22)	LB	Temnorumena, privzdignjena
17	OB3(22)	LB	Bela z rumenim reverzom, nesvetleča, ploščata, trda
18	OB4(22)	LB	Svetlorumena, svetleča, okrogla, privzdignjena
19	OB3(8)	LB	Krem, ploščata, gladek rob, svetleča
20	OB4(8)	LB	Rumena, prosojna
21	RT1(22)	LB	Krem, svetleča, neprosojna, ploščata, nazobčan rob
22	RT3(22)	LB	Krem, svetleča, ploščata, nazobčan rob
23	RT4(22)	LB	Rožnata, svetleča, privzdignjena, prosojna gladek rob, razlita
24	SK2(22)	LB	Prosojna, rahlo privzdignjena; PK okrogle ali nepravilne, nazobčan rob
25	SK3(22)	LB	Rumena, svetleča, gladek rob
26	SK4(22)	LB	Svetlooranžna, svetleča, neprosojna, nepravilna oblika
27	VP1(22)	LB	Bela, neprosojna, trda, jasno ločene PK
28	VP2(22)	LB	Rumena, "posušena tempera"
29	VP3(22)	LB	Krem, svetleča, razlita, valovit rob, rahlo privzdignjena
30	VP4a(22)	LB	Krem/bela, valovit rob, svetleča, nagubana, ploščata
31	VP4b(22)	LB	Krem, nagubana
32	BO1(22)	M9+Glc	Svetlooranžna, točkasta (drobna)
Izolati			
Izolati	Gojišče	Makromorfološki opis	
33	BO2(22)	M9+Glc	Bela, okrogla, privzdignjena, gladek rob
34	FS1(22)	M9+Glc	Krem, točkasta (drobna), prosojna, svetleča, privzdignjena
35	FS2(22)	M9+Glc	Bela, svetleča, okrogla, privzdignjena, razlita
36	FS3(22)	M9+Glc	Bela, točkasta (drobna)
37	FS4(22)	M9+Glc	Rožnatooranžna, svetleča, razlita, privzdignjena
38	KP1(15)	M9+Glc	Bela, okrogla
39	KP3(15)	M9+Glc	Oranžna, kroglasta, svetleča, rahlo razlita, gladek rob
40	KP3(22)	M9+Glc	Oranžna, kroglasta, razlita, privzdignjena, gladek rob
41	MM1(22)	M9+Glc	Kremnorumena, sluzasta, razlita, gladek rob, svetleča
42	MM2(22)	M9+Glc	Krem, prosojna, valovit rob
43	MM3(22)	M9+Glc	Rumena z belim reverzom, svetleča, razlita, sluzasta, gladek rob

4.1.2 Morski sediment

Preglednica 9 je seznam domnevno čistih kultur aerobnih izolatov iz morskih sedimentov. Prikazuje tudi vir in makromorfološki opis.

Preglednica 9: Aerobni izolati iz morskih sedimentov ter blata z dna Strunjanskega potoka (A ... izolat z agarolitično aktivnostjo). **Preglednica 9** se nadaljuje na naslednji strani.

	Izolat	Vir	Makromorfološki opis
1	ASW1	V4	Bela, okrogla (3 mm), A*
2	ASW2	V3 ¹	Bela s piko, okrogla (2 mm)
3	ASW3	V1	Bela, gladka, okrogla (1-2 mm)
4	ASW4	V2	Bela, gladka, okrogla (3 mm)
5	ASW5	V2	Bela, prosojna; 3 mm
6	ASW6	V2	Bela rozeta; 4 mm
7	ASWG1	V4	Bela, gladka, okrogla (3 mm)
8	ASWG2	V1	Bela, gladka, okrogla (1 mm)
9	ASWG3	V1	Bela s piko, gladka, okrogla (2 mm)
10	ASWG5	V3	Obrobjena, okrogla (4 mm), A
11	ASWK1	V2	Bela, gladka, okrogla (3 mm)
12	ASWK2	V3	Krem, gladka, okrogla (3 mm), A
13	ASWK4	V3	Svetlo rumena, gladka, okrogla (3 mm)
14	ASWK6	V4	Okrogla (2 mm), A
15	ASWK7	V1	Rumena, okrogla (2 mm), A
16	ASWK8	V3	Temna, okrogla (3 mm), A
17	ASWK9	V3 ¹	Bela z obrobo, okrogla (2 mm), A
18	ASWK10	V5	Rumena s piko, okrogla (3 mm)
19	ASWK12	V5	Živordeča, okrogla (1 mm)
20	ASWK13	V6	Rožnata (do 2 mm) in bele (3 mm)
21	ASWK14	V2	Rumena, gladka, okrogla (3 mm)
22	SW1	V2	Bela, okrogla (1 mm), A
23	SW2	V2	Bela, okrogla (1 mm), A
24	SW3	V3	Skupina; krem, nazobčan rob, A
25	SW4	V4	Krem, nazobčan rob; 2 mm
	Izolat	Vir	Makromorfološki opis
26	SWG1	V1	Bela, gladka, okrogla (1 mm)
27	SWG2	V2	Bela, okrogla (2 mm)
28	SWG3	V3	Bela, gladka, okrogla (1 mm)
29	SWG5	V1	Rumena, gladka, okrogla (3 mm)
30	SWG6	V1	Krem, svetleča, okrogle (3 mm)
31	SWK3	V3	Bela, nazobčana; 5 mm
32	SWK4	V6	Bela, kompaktna, okrogla (3 mm)
33	SWK5	V6	Rumena, trda, okrogla (3 mm)
34	SWK7	V2	Rumena, nazobčana; 5 mm
35	SWK8	V3	Rumena, trda, nazobčana; 3 mm
36	SWK9	V3	Bela, gladka, okrogla (4 mm)
37	SWK11		Krem, nazobčana; 5 mm

38	SWK12		Rahlo vijoličasta, okrogla (2 mm); A
39	SWK13	V6	Rumena, svetleča, okrogla (3 mm)
40	SWK14	V2	Rožnata, okrogla, svetleča; 2 mm
41	SWK15	V6	Rumena, svetleča, okrogla (4 mm)

Večina izolatov izvira iz površinskih slojev sredic 1 ali 2, pridobljenih iz sedimenta v sredini Piranskega zaliva. Dva izolata (ASWK10 in ASWK12) izvirata iz spodnjega sloja sredice 1. Sedem izolatov je iz blata z dna Strunjanskega potoka, deset pa z dna kopališča ob Strunjanskem pomolu. Večina izolatov je iz neredčenih ali desetkrat redčenih vzorcev (ni prikazano). Iz tisočkrat redčenih vzorcev smo pridobili pet izolatov: dva iz kopališča ob Strunjanskem pomolu, po enega pa iz zgornjih slojev sredic 1 in 2 ter srednjega sloja iz sredine Piranskega zaliva. Izolacija in gojenje mikroorganizmov iz stotisočkrat redčenih vzorcev nista uspela. Na ASW, ASW Kaz in SW Glc smo izolirali mikrobe z vseh treh vzorčevalnih lokacij. Na ASW Glc so zrastle mikrobi iz Strunjanskega potoka ter zgornjega in srednjega sloja sredice 1 iz Piranskega zaliva, na SW mikrobi iz strunjanskega kopališča ter zgornjega in srednjega sloja sredice 1, na SW Kaz pa mikrobi iz strunjanskega kopališča ter zgornjih slojev sredic 1 in 2. Kolonije so bile morfološko nezanimive, majhne (premer med 1-5 mm) in večinoma nepigmentirane. Štiri rumene kolonije smo izolirali na ASW Kaz iz vzorcev Strunjanskega potoka ter zgornjega in spodnjega sloja sredice 1. Pet rumenih kolonij smo izolirali na SW Kaz iz strunjanskega kopališča ter zgornjih slojev sredic 1 in 2. Eno rumeno kolonijo smo izolirali iz blata Strunjanskega potoka na Sw Glc. Ena kolonija je bila rahlo vijoličasta, ena živordeča in ena temne barve. Agarolitično aktivnost smo opazili pri skupno 11 izolatih, od katerih smo jih pet izolirali iz zgornjega sloja sredice 1 (enega na SW Glc, tri na ASW Kaz in enega na SW), po dva iz srednjega sloja sredice 1 (na ASW in ASW Kaz) in Strunjanskega kopališča (oba na SW1) ter enega iz blata Strunjanskega potoka. Agarolitične aktivnosti pa nismo opazili pri izolatih na SW Glc iz vzorcev strunjanskega potoka in kopališča in zgornjega sloja sredice 1. Na SW Kaz je zrasel en sam agarolitični izolat.

4.2 FENOTIPSKI TESTI

Preglednica 10 podaja rezultate barvanja po Gramu in mikromorfološki opis ter rezultate katalaznega testa in KOH-testa za domnevno čiste kulture sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja.

Preglednica 10: Rezultati barvanja po Gramu, katalaznega testa in testa s 3-odstotnim KOH ter mikromorfološki opis domnevno čistih kultur sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja. **Preglednica 10** se nadaljuje na naslednji strani.

	Izolat	Gojišče	Gram	3 % KOH	Katalaza	Mikromorfološki opis
1	BD1(22)	LB	+	-	+	Velike, kvadrataste celice v tetradah in skupkih
2	BD2(22)	LB	+	-	+	Velike kvadrataste celice v tetradah in skupkih
3	BD3(22)	LB	+	(-)	+	Posamične paličice, nekatere v paru po dolžini ali širini; nekatere z 1-3 vključki
4	BD4(22)	LB	+	(-)	+	Paličice v parih (po dolžini ali širini) ali krajših verižicah (do 4 celice)
5	BO3(22)	LB	+	(+)	+	Ravne (nerigidne) in ukrivljene vitke in dolge paličice
6	KJ1(22)	LB	-	-	-	Ravne in ukrivljene paličice, nekatere z 1-5 vključki
7	KJ3(22)	LB	+	-	+	Gibke, tanke paličice, skoraj niti; pari
8	KJ4(22)	LB	+	-	(+)	
9	MR1(22)	LB	+/-var	-	+	Vitke, tanke, dolge nagrmadene paličice
10	MR2(22)	LB	+/-var	-	+	
11	MR3(22)	LB	+	-	+	Pravilne kroglaste v parih in tetradah, zelo redke posamične
12	MR4(22)	LB	+	-	šibko +	Podaljšane kroglaste in kijaste oblike v parih, stebričih, verižicah; V-oblike
13	NS1(22)	LB	+	-	+	Majhne kroglaste celice v skupkih, verižicah, tetradah, parih
14	NS2(22)	LB	+	-	+	Dolge, tanke, ravne, gibke paličice; tvorijo filamente v ovoju
15	OB1(22)	LB	+	-	+	Dolge, tanke, ponekod razvejane/razcepljene niti
16	OB2(22)	LB	+	+	šibko +	
17	OB3(22)	LB	+	-	+	Kijaste celice v V-parih in skupkih
18	OB4(22)	LB	+	-	+	
19	OB3(8)	LB	+	-	+	
20	OB4(8)	LB	+	-	-	
21	RT1(22)	LB	+	-	+	Velike podolgovate celice z enim velikim podolgovatim vključkom
22	RT3(22)	LB	+	+	+	Ravne paličice (d~3R) z oblimi konci; posamično, pari, verižice (3 do >8)
23	RT4(22)	LB	+/-var	-	šibko +	
24	SK2(22)	LB	+	-	+	Majhne ravne in ukrivljene paličice, nekatere z vključki
25	SK3(22)	LB	+	(+)	šibko +	Drobne ravne in ukrivljene paličice
26	SK4(22)	LB	-	+	šibko +	Čokate paličice, posamično, v skupkih
27	VP1(22)	LB	+	+	+	Podaljšane kroglaste in kijaste oblike, V-oblike v parih, verižicah (3 do >14)
28	VP2(22)	LB	+/-var	-	+	
29	VP3(22)	LB	+	-	+	Paličice z zoženimi oblimi konci; pari in stebriči (po dolžini)
	Izolat	Gojišče	Gram	3 % KOH	Katalaza	Mikromorfološki opis
30	VP4a(22)	LB	+/-var	-	+	Kratke paličice, posamično in v parih
31	VP4b(22)	LB	+	-	+	Paličice, nekatere z neobarvanimi kroglastimi vključki
32	BO1(22)	M9+Glc	+/-var	-	+	Paličice, nekatere kijaste
33	BO2(22)	M9+Glc	+	-	šibko +	Ukrivljene čokate paličice z močnejše obarvanimima koncema
34	FS1(22)	M9+Glc	+	+	-	

35	FS2(22)	M9+Glc	+	-	+	Velike čokate celice s po enim velikim neobarvanim vključkom; v ovojnici
36	FS3(22)	M9+Glc	+	-	+	Tanke paličice; skupki ali neurejeni prepleti
37	FS4(22)	M9+Glc	-	-	+	Drobne celice v parih in V-oblikah; čokate paličice; skupki, stebriči
38	KP1(15)	M9+Glc	+	?	-	Tanke in dolge ukrivljene paličice
39	KP3(15)	M9+Glc	+	+	šibko +	Paličice, nekatere terminalno zaobljene z vključki
40	KP3(22)	M9+Glc	+	+	+	Rigidne paličice in kijaste oblike; skupki, stebriči, V-pari
41	MM1(22)	M9+Glc	var	-	-	Velike, čokate, precej oglate celice; stebriči in pari
42	MM2(22)	M9+Glc	-	-	šibko +	Drobne paličice, nekatere kijaste; posamični, V-pari
43	MM3(22)	M9+Glc	+	+	zelo šibko	Paličaste, z inkluzijami

Gram...barvanje po Gramu; + (-)...celice se barvajo po Gramu pozitivno, var...celice se barvajo po Gramu spremenljivo, +/-var...celice se barvajo po Gramu pozitivno ali spremenljivo

3 % KOH ... test s 3-odstotnim KOH (Buck, 1982; Moaledj, 1986); + ... suspenzija je postala viskozna, - ... suspenzija ni postala viskozna, (+) ali (-)...izid ni nedvoumno pozitiven ali negativen, ? ... nedoločljivo

Katalaza ... katalazni test; + ... pojav mehurčkov, - ... brez sprememb

Mikromorfologijo celic smo opazovali na gramsko obarvanih preparatih, pri izbranih izolatih pa smo prisotnost endospor ugotavljali z diferencialnim barvanjem po Schaeffer in Fultonu (1933) (Mormak in Cassida, 1985).

Celice so bile mikromorfološko raznolike in zanimive. Prevladujejo paličice in celice v obliki kija ali gorjače. Redko smo naleteli na posamične celice; večinoma so bile v bočnih ali čelnih parih. Kijaste celice so bile dalje organizirane v V-pare in stebriče, redko posamične. Celice BD1(22) ter BD2(22) (oba LB in G+) so bile organizirane v tetrade in skupke tetrad. Pri izolatu FS2(22) M9+Glc (G+) so prevladovali debeli, upognjeni, lomljeni filamentni iz paličastih celic, obdanih z ovojnico in amorfim materialom. Posamezne celice so bile redke.

Večina (32 od 43 ali 74,82 %) izolatov se je barvala nedvoumno po Gramu pozitivno, nadaljnih 6 (13,95 %) po Gramu pozitivno ali spremenljivo in le štirje (KJ1(22) SK4(22), oba LB; FS4(22), MM2(22), oba M9+Glc) (9,30 %) po Gramu negativno. Test s 3-odstotnim KOH (Buck, 1982; Moaledj, 1986) je bil nedvoumno pozitiven v šestih (13,95 %) primerih, dvoumen v petih (11,63 %) in negativen v tridesetih (69,77 %). V slabi polovici primerov (20 ali 46,51 %) je bilo gramsko barvanje pozitivno, KOH-test pa negativen, le v primeru SK4(22) LB je bilo obratno. V treh (KJ1(22) LB; FS4(22) in MM2(22), oba M9+Glc) (sedmih;

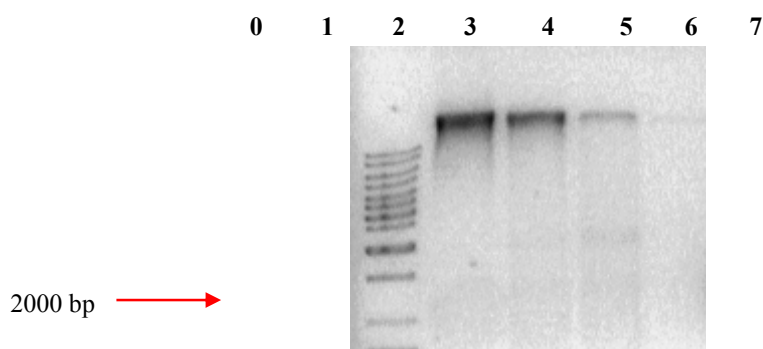
16,28 %) primerih sta bila rezultata obeh testov negativna (pozitivna). Pri gramsko variabilnih izolatih je bil KOH-test negativen.

Katalazni test je bil v štirih (KJ1(22), OB4(8), oba LB; FS1(22), MM1(22), oba M9+Glc) primerih negativen, v 31-ih (72,09 %) pozitiven in v devetih (20,93 %) šibko pozitiven.

Pri barvanju po Schaeffer in Fultonu smo endospore ugotovili pri naslednjih koseških izolatih: NS2(22) LB (ena podolgovata in debelejša od vegetativne celice, centralno); RT1(22) LB (ovalne); RT3(22) LB (ovalne, limonaste); RT4(22) LB (ena podolgovata na celico; centralno); FS1(22) M9+Glc (različna pozicija endospor; podolgovate, nekatere ukrivljene); KP3(15) M9+Glc (ena čokata, terminalno); KP3(22) M9+Glc (ena ali dve podolgovati/čokati; subterminalno ali terminalno); MM3(22) M9+Glc (podolgovate; subterminalno).

4.3 IZOLACIJA GENOMSKE DNK IZ ČISTIH KULTUR

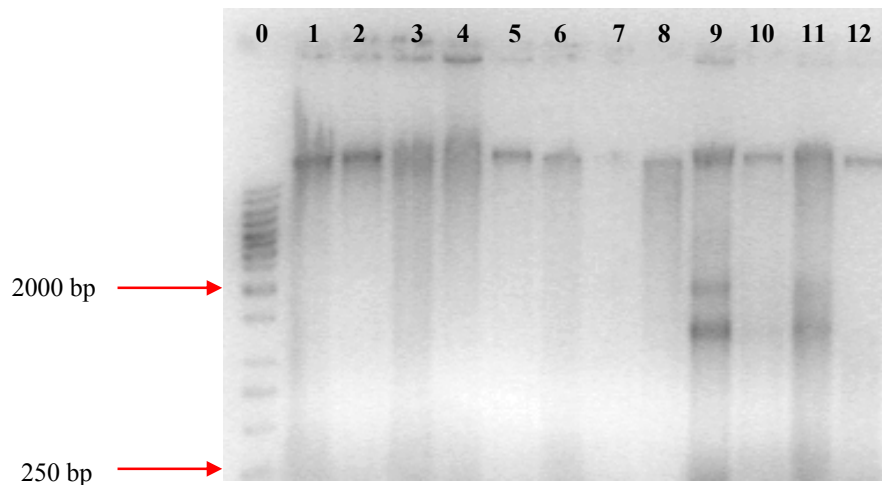
Slika 8 prikazuje elektroforetsko ločitev genomske DNK, izolirane iz domnevno čistih kultur sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja ter fragmentov velikostnega standarda, **Slika 9** pa elektroforetsko ločitev mikrobne DNK, izolirane iz domnevno čistih kultur sedimentnih izolatov iz Piranskega zaliva, kopališča ob strunjanskem pomolu ter DNK Strunjanskega potoka v Strunjanskih solinah blizu zaliva Sv. Duha. V **Preglednici 11** je navedeno, iz katerih izolatov smo uspeli izolirati genomsko DNK, iz katerih pa ne.



250 bp →

Slika 8: Elektroforetska ločitev mikrobne genomske DNK iz domnevno čistih kultur izolatov iz sedimentov Koseškega bajerja. Nanesli smo 5 µl vzorca. Od leve proti desni si sledijo: **0** - 1 kb lestvica; **1** - RT3(22) LB; **2** - RT4(22) LB; **3** - SK2(22) LB; **4** - SK3(22) LB; **5** - SK4(22) LB; **6** - VP1(22) LB; **7** - VP2(22) LB.

Izolacija DNK je bila uspešna v vseh linijah. Količina izolirane genomske DNK v linijah 4, 5 in 7 je bila majhna. V liniji 5 opazimo dodatne proge na višinah ≤ 250 , 1000-1500 bp, 2 kbp in 10 kbp; proge na višinah ≤ 250 bp in 1000-1500 bp so intenzivnejše od pričakovane proge izolirane genomske DNK. V liniji 6 je izolirana genomska DNK fragmentirana, pojavili pa sta se tudi dodatni progi na višinah 1000-1500 bp in 2000 bp. Dodatne proge si je moč razložiti kot fragmente določene dolžine izolirane genomske DNA, prisotnost plazmidov ali RNK.



Slika 9: Elektroforetska ločitev mikrobne genomske DNK iz domnevno čistih kultur izolatov iz sedimentov Piranskega zaliva, kopališča ob strunjanskem pomolu in blata z dna Strunjanskega potoka. Nanesli smo 5 µl vzorca. Od leve proti desni si sledijo: **0** - 1 kb lestvica; **1 do 6** - ASW1, 2, 3, 4, 5, 6; **7 do 10** - ASWG1, 2, 3, 5; **11 in 12** - ASWK1, 2.

Izolacija genomske DNK je bila uspešna v vseh linijah. Količina izolirane genomske DNK v

liniji 7 je bila majhna. Izolirana DNK je bila fragmentirana v linijah 1, 3, 4, 8, 9 in 11. V linijah 9 in 11 so se pojavile dodatne proge na višinah 1000-1500 bp in 2 kbp.

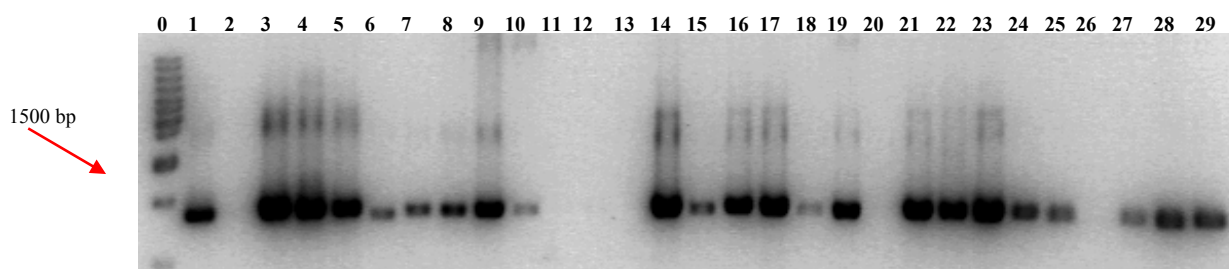
4.4 POMNOŽEVANJE 16S rDNK S PCR

4.4.1 Pomnoževanje 16S rDNK sedimentnih izolatov iz Koseškega bajerja

Za pomnoževanje 16S rDNK smo uporabili štiri pare začetnih oligonukleotidov (**Preglednica 4**).

Slika 10 prikazuje elektroforetsko ločitev PCR-produktov po pomnoževanju 16S rDNK domnevno čistih kultur izolatov iz sedimentov Koseškega bajerja s parom fD1/1401r.

Preglednica 11 povzema rezultate izolacije DNK in PCR-pomnoževanja s štirimi pari začetnih oligonukleotidov (fD1/1392r, fD1/1401r, Eub338f/1392r, Eub338f/1401r) za sladkovodne in morske sedimentne izolate.



Slika 10: Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK s PCR in začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1401r. Nanesli smo 5 µl vzorca. Od leve proti desni si sledijo: **0** - 1 kb lestvica; **1** - BD1(22) LB; **2** - BD2(22) LB; **3** - BD3(22) LB; **4** - BD4(22) LB; **5** - BO3(22) LB; **6** - KJ1(22) LB; **7** - KJ3(22) LB; **8** - KJ4(22) LB; **9** - MR1(22) LB; **10** - MR2(22) LB; **11** - MR3(22) LB; **12** - MR4(22) LB; **13** - NS1(22) LB; **14** - NS2(22) LB; **15** - OB1(22) LB; **16** - OB2(22) LB; **17** - OB3(22) LB; **18** - OB4(22) LB; **19** - OB3(8) LB; **20** - OB4(8) LB; **21** - RT1(22) LB; **22** - RT3(22) LB; **23** - RT4(22) LB; **24** - SK2(22) LB; **25** - SK3(22) LB; **26** - SK4(22) LB; **27** - VP1(22) LB; **28** - VP2(22) LB; **29** - VP3(22) LB.

PCR je bil uspešen v 23 linijah, v šestih (2., 11., 12., 13., 20. in 21.) pa neuspešen. Nespecifični produkti pomnoževanja (na višini >2500 bp) so prisotni v 13 linijah.

Preglednica 11: Uspešnost izolacije genomske DNK ter pomnoževanja 16S rDNK s štirimi pari začetnih oligonukleotidov za sedimentne izolate iz Koseškega bajerja. **Preglednica 11** se nadaljuje na naslednji strani.

	Izolat	DNK vidna na gelu	fD1/1392r	Eub338f/1392r	fD1/1401r	Eub338f/1401r
1	BD1(22) LB	+	+	+	+	/
2	BD2(22) LB	+	-	+	-	/
3	BD3(22) LB	+	+	+	+	/
4	BD4(22) LB	+	+	+	+	/
5	BO3(22) LB	+	+	+	+	/
6	KJ1(22) LB	+	+	+	+	/
7	KJ3(22) LB	+	+	+	+	/
8	KJ4(22) LB	+	+	-	+	/
9	MR1(22) LB	+	+	+	+	/
10	MR2(22) LB	+	+	-	+	/
11	MR3(22) LB	+	-	-	-	/
12	MR4(22) LB	-	-	-	-	/
13	NS1(22) LB	-	-	+	-	/
14	NS2(22) LB	+	+	+	+	/
15	OB1(22) LB	+	+	-	+	/
16	OB2(22) LB	-	+	-	+	/
	Izolat	DNK vidna na gelu	fD1/1392r	Eub338f/1392r	fD1/1401r	Eub338f/1401r
17	OB3(22) LB	+	+	-	+	/
18	OB4(22) LB	+	-	-	+	/
19	OB3(8) LB	+	-	-	+	/
20	OB4(8) LB	-	+	-	-	/
21	RT1(22) LB	+	+	-	+	/
22	RT3(22) LB	+	+	+	+	+
23	RT4(22) LB	+	+	+	+	+
24	SK2(22) LB	+	+	+	+	+
25	SK3(22) LB	+	+	+	+	+
26	SK4(22) LB	+	+	+	-	-
27	VP1(22) LB	+	+	+	+	+
28	VP2(22) LB	+	-	+	+	+
29	VP3(22) LB	-	+	+	+	+
30	VP4a(22) LB	-	+	+	+	+
31	VP4b(22) LB	-	+	+	+	+
32	BO1(22) M9+Glc	+	+	+	+	+
33	BO2(22) M9+Glc	+	+	+	+	+
34	FS1(22) M9+Glc	+	+	-	-	+
35	FS2(22) M9+Glc	+	+	+	+	+
36	FS3(22) M9+Glc	-	/	/	-	-
37	FS4(22) M9+Glc	+	/	/	-	-
38	KP1(15) M9+Glc	-	/	/	-	-

39	KP3(15) M9+Glc	+	/	/	-	-
40	KP3(22) M9+Glc	+	/	/	-	-
41	MM1(22) M9+Glc	-	/	/	-	-
42	MM2(22) M9+Glc	-	/	/	+	+
43	MM3(22) M9+Glc	+	/	/	-	-

Genomsko DNK smo uspeli izolirati iz skupno 32 bajerskih izolatov (24 zraslih na LB in 8 na M9+Glc), iz 11 (7 z LB, 4 z M9+Glc) pa ne. Izolirana genomsko DNK je bila fragmentirana pri 18 izolatih (12 z LB, 6 z M9+Glc).

Pomnoževanje 16S rDNK je bilo uspešno pri večini izolatov, kjer je bila izolirana genomsko DNK vidna na gelu. Nekaj je primerov, kjer izolirana genomsko DNK ni bila vidna na gelu, pomnoževanje 16S rDNK pa je bilo uspešno. Velja tudi obratno – pričakovanega produkta pomnoževanja nismo dobili pri nekaterih primerih, kjer je bila izolirana genomsko DNK vidna na gelu. Nekaj primerov je takih, kjer niti izolacija genomske DNK niti namnoževanje 16S rDNK nista bila uspešna.

Izbrani segment 16S rDNK smo s parom fD1/1392r uspeli namnožiti v 28 primerih, v sedmih pa ne. Pomnoževanje je bilo uspešno pri petih izolatih (OB2(22), OB4(8), VP2(22), VP4a(22) in VP4b(22), vsi z LB), pri katerih izolirana genomsko DNK ni bila vidna na gelu. Namnoževanje je bilo neuspešno pri petih sevih (BD1(22), MR3(22), OB4(22), OB3(8) in VP2(22), vsi z LB), iz katerih smo uspešno izolirali genomsko DNK. Tako izolacija genomske DNK kot tudi PCR sta bila neuspešna pri izolatih MR4(22) LB in NS1(22) LB.

S parom fD1/1401r smo uspeli izbrani odsek 16S rDNK namnožiti v 29 primerih, v 14 pa ne. Namnoževanje je bilo uspešno v petih primerih, kjer izolirana genomsko DNK ni bila vidna na gelu (OB2(22), VP3(22), VP4a(22), VP4b(22), vsi LB; MM2(22) M9+Glc). V sedmih primerih (BD2(22), SK4(22), oba LB; FS1(22), FS4(22), KP3(15), KP3(22), MM3(22), vsi M9+Glc) je bila izolacija DNK uspešna, namnoževanje pa ne. V petih primerih (MR4(22),

NS1(22), OB4(8), vsi LB; FS3(22), in MM1(22), vsi M9+Glc) sta bila tako izolacija DNK kot tudi PCR neuspešna.

Pomnoževanje izbranega odseka 16S rDNK s parom Eub338f/1392r je bilo uspešno v 23 primerih in neuspešno v dvanajstih. Pričakovani produkt smo dobili v štirih primerih (NS1(22), VP2(22), VP4a(22) in VP4b(22), vsi LB) pri katerih izolirana genomska DNK ni bila vidna na gelu. V devetih primerih (KJ4(22), MR2(22), MR3(22), MR4(22), OB1(22), OB3(22), OB4(22), OB3(8), RT1(22), vsi LB; M9+Glc) je bila izolacija genomske DNK uspešna, pomnoževanje pa neuspešno. Tako izolacija genomske DNK kot tudi PCR sta bila neuspešna v treh primerih (MR4(22), OB2(22) in OB4(8), vsi LB).

Pomnoževanje izbranega odseka 16S rDNK s parom Eub338f/1401r je bilo uspešno v 14 primerih in neuspešno v osmih. Pričakovani produkt smo dobili v štirih primerih (VP3(22), VP4a(22), VP4b(22), vsi LB; MM2(22) M9+Glc) pri katerih izolirana genomska DNK ni bila vidna na gelu. V petih primerih (SK4(22) LB; FS4(22), KP3(15), KP3(22) in MM3(22), vsi) je bila izolacija genomske DNK uspešna, pomnoževanje pa neuspešno. Tako izolacija genomske DNK kot tudi PCR sta bila neuspešna v treh primerih (MM1(22), FS3(22) in KP1(15), vsi M9+Glc).

4.4.2 Pomnoževanje 16S rDNK morskih sedimentnih izolatov

Preglednica 12: Uspešnost izolacije genomske DNK ter pomnoževanja 16S rDNK z dvema paroma začetnih oligonukleotidov za morske sedimentne izolate (SWG=SW Glc, SWK=SW Kaz, ASWG=ASW Glc, ASWK=ASW Kaz)

	Izolat	DNK vidna na gelu	fd1/1401r	Eub338f/1401r
1	ASW1	+	+	+
2	ASW2	+	+	+
3	ASW3	+	+	+
4	ASW4	+	+	+
5	ASW5	+	+	+
6	ASW6	+	+	+
7	ASWG1	+	+	+
8	ASWG2	+	+	+

9	ASWG3	+	+	+
10	ASWG5	+	+	+
11	ASWK1	+	+	+
12	ASWK2	+	+	+
13	ASWK4	+	+	+
14	ASWK6	+	+	+
15	ASWK7	+	+	+
16	ASWK8	+	+	+
17	ASWK9	+	+	+
18	ASWK10	+	+	+
19	ASWK12	+	+	+
20	ASWK13	+	+	+
21	ASWK14	+	+	-
22	SW1	-	+	+
23	SW2	+	+	/
24	SW3	+	+	+
25	SW4	+	+	/
26	SWG1	-	-	/
27	SWG2	+	+	/
28	SWG3	+	+	/
29	SWG5	+	+	/
30	SWG6	+	+	+
31	SWK3	+	+	+
32	SWK4	+	+	/
33	SWK5	+	+	/
34	SWK7	+	+	/
35	SWK8	+	+	/
36	SWK9	+	+	/
37	SWK11	+	+	/
38	SWK12	+	+	/
39	SWK13	+	+	/
40	SWK14	+	+	/
41	SWK15	-	-	/

Izolacija DNK iz domnevno čistih kultur morskih sedimentnih izolatov je bila uspešna v 38 primerih, v treh (SW1, SWG1, SWK15) pa ne.

Pomnoževanje 16S rDNK s parom fD1/1401r je bilo uspešno v 39 primerih. V obeh primerih (SWG1, SWK15), ko je bilo pomnoževanje neuspešno, je bila neuspešna tudi izolacija genomske DNK. Pri izolatu SW1 je bilo pomnoževanje uspešno, izolirana genomska DNK pa na gelu ni bila vidna.

Pomnoževanje izbranega odseka 16S rDNK s parom Eub338f/1401r je bilo uspešno v 17 primerih. V neuspešnem primeru (ASWK14) je bila neuspešna tudi izolacija genomske DNK. V primeru SW1 – kot pri pomnoževanju z fD1/1401r - smo dobili pričakovani produkt, izolirana genomska DNK pa na gelu ni bila vidna.

4.4.3 *In silico* analiza specifičnosti začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v PCR

V bazi RDP II.9 (Cole in sod, 2005) smo z uporabo orodja Probe Match ugotavljali, kakšen odstotek kvalitetnih (izbira *Good* v razdelku *Quality*) deponiranih sekvenc, daljših ali enakih 1200 bp, predstavljajo zadetki iskanja z začetnimi oligonukleotidi fD1, Eub338f, 1392r in 1401r. Dopustili smo nič, eno, dve ali tri neujemanja. Zanimala nas je tudi pokritost posameznih taksonomskih skupin. Rezultati so prikazani v **Preglednici 13**.

Preglednica 13: Odstotek sekvenc, daljših ali enakih 1200 bp, ki jih lahko odkrijemo z začetnimi oligonukleotidi fD1, Eub338f, 1392r in R-1401 v bazi RDP II, Release 9 (RDP II.9) pri dopuščenih nobenem, enem, dveh ali treh neujemanjih. V primerih Eub338f, 1392r in R-1401 sta bili dopuščeni največ dve neujemanji. V bazi je bilo na dan iskanja (6.9.2006) skupno deponiranih 253813 sekvenc, od tega 95353 kvalitetnih in daljših ali enakih 1200 bp.

Začetni oligonukleotid	Odstotek zadetkov			
	Število neujemanj			
	0	1	2	3
fD1	13,33	22,7	26,08	27,41
Eub338f	92,75	96,94	98,85	/
1392r	68,10	72,53	73,36	/
R-1401*	13,61	68,05	73,13	/

*glej **Preglednico 4** in opombe; iskanje s 1401r, ki se od R-1401 razlikuje v dveh nukleotidih, je dalo pri nič dopuščenih neujemanjih en sam zadetek (v deblu *Actinobacteria*). Pri enem (dveh) dopuščenem neujemanju pa zadetki predstavljajo 13,99 % (68,75 %) nabora sekvenc, kar je primerljivo rezultatom iskanja z R-1401.

Iskanje z fD1 je dalo najmanjše število zadetkov. Pri zahtevi, da med tarčnim in iskalnim zaporedjem ne sme biti neujemanj, so zadetki predstavljali dobro desetino. Pri dopuščenem enem neujemanju se je delež zadetkov povečal na približno petino in pri dopuščenih dveh

neujemanjih na četrtno ter ostal skoraj nespremenjen pri dopuščenih treh neujemanjih. Med proteobakterijami, ki so predstavljale 37,27 % sekvenc, fD1 na tarčno zaporedje nalega brez neujemanj v 14,74 %, z dopuščenimi tremi neujemanji pa v 33,98 %. V Deblu *Firmicutes* je imelo tarčno zaporedje za fD1 brez neujemanj (s tremi neujemanji) 12,98 % (22,13 %) sekvenc, med aktinobakterijami 14,49 % (25,95 %), med spirohetami 5,54 % (20,2 %), med bakteroidetami 9,42 % (16,43 %) ter med verukomikrobiji 10,93 % (34,7 %) sekvenc. Odstotek odkritih sekvenc s tarčnim zaporedjem je povezan z mestom v sekvenci, kamor nalega začetni oligonukleotid.

Tudi iskanje z R-1401 je pri zahtevi popolnega ujemanja med tarčnim in iskalnim zaporedjem odkrilo primerljiv odstotek zadetkov kot iskanje z fD1 pod enakim pogojem, toda že pri enem dopuščenem neujemanju se je odstotek zadetkov petkrat povečal in se pri dopuščenih dveh neujemanjih ni bistveno spremenil. Med proteobakterijami, ki so predstavljale 37,27 % sekvenc, fD1 na tarčno zaporedje nalega brez neujemanj v 14,74 %, z dopuščenimi tremi neujemanji pa v 33,98 %. V Deblu *Firmicutes* je imelo tarčno zaporedje za fD1 brez neujemanj (s tremi neujemanji) 12,98 % (22,13 %) sekvenc, med aktinobakterijami 14,49 % (25,95 %), med spirohetami 5,54 % (20,2 %), med bakteroidetami 9,42 % (16,43 %), med cianobakterijami 12,21 % (27,44 %) ter med verukomikrobiji 10,93 % (34,7 %) sekvenc.

Delež zadetkov v odsotnosti neujemanj je pri iskanju s 1392r predstavljal 68,10 % deponiranih sekvenc ≥ 1200 bp in se pri povečevanju števila neujemanj ni bistveno spreminjal. Pri dopuščenih dveh neujemanjih sta deleža zadetkov iskanja z R-1401 in 1392r podobna. Med proteobakterijami, ki so predstavljale 37,27 % sekvenc, 1392r na tarčno zaporedje nalega brez neujemanj v 82,95 %, z dopuščenimi tremi neujemanji pa v 33,98 %. V Deblu *Firmicutes* (28,82 % sekvenc) je imelo tarčno zaporedje za 1392r brez neujemanj (s tremi neujemanji) 56,15 % (22,13 %) sekvenc, med aktinobakterijami 14,49 % (25,95 %), med spirohetami 5,54 % (20,2 %), med bakteroidetami 9,42 % (16,43 %) med cianobakterijami 92,5 % (94,47 % pri dopuščenem enem neujemanju) ter med verukomikrobiji 10,93 % (34,7 %) sekvenc.

Zadetki iskanja z Eub338f predstavljajo največji odstotek deponiranih sekvenc z dolžino 1200 bp ali več. Že pod pogojem nedopuščanja neujemanj ima tarčno zaporedje za Eub338f preko devet desetih deponiranih sekvenc, pri dopuščenih treh neujemanjih pa je dosežena skoraj 99-odstotna pokritost. Med proteobakterijami Eub338f na tarčno zaporedje nalega brez neujemanj v 96,04 %, z dopuščenimi tremi neujemanji pa v 99,59 %. V Deblu *Firmicutes* je imelo tarčno zaporedje za Eub338f brez neujemanj (s tremi neujemanji) 94,56 % (99,80 %) sekvenc, med aktinobakterijami 93,83 % (99,77 %), med spirohetami 95,09 % (100 %), med bakteroidetami 97,36 % (99,78 %), med cianobakterijami 92,66 % (99,56 %) ter med verukomikrobiji 0 % (97,81 %) sekvenc.

Kljub nizkemu odstotku zadetkov v bazi RDP II.9 pri iskanju z fD1 in R-1401, še posebno pa zastrašujoče nizkemu številu zadetkov pri iskanju s 1401r, smo se odločili za uporabo produktov pomnoževanja s parom fD1/1401r, saj je bilo število slednjih pri pogojih pomnoževanja, uporabljenih v tej nalogi, največje.

4.5 VIRTUALNI PCR IN VIRTUALNA RESTRIKCIJSKA ANALIZA

4.5.1 Nabor sekvenc

Preglednica 14 prikazuje razporeditev 770 (0,91 % vseh v bazi 10.04.2006) zaporedij - zadetkov iskanja po bazi sekvenc 16S rDNK na spletni strani RDP II.9 z geslom *freshwater sediment* - po posameznih taksonomskih kategorijah.

Preglednica 14: Število zadetkov v posamezni taksonomski kategoriji pri iskanju po bazi podatkov o dolžini in sekvenci 16S rDNK z nizom *freshwater sediment*. Iskalni parametri so zajeli zaporedja 16S rDNK gojenih in negojenih, tipskih in netipskih sevov, daljša in krajša od 1200 bp ter taksonomsko ureditev po Bergeyjevem priročniku za sistematsko bakteriologijo. Iskanje je bilo opravljeno 10. aprila 2006 in 20. avgusta 2006. [Ph...Phylum (Deblo); Cl...Classis (Razred); gis...Genus/Genera incertae sedis (Rod/Rodovi z negotovo taksonomsko pozicijo)]

	Kategorija	10. 04. 2006	20. 08. 2006
<i>Bacteria</i>	Domena	770	791
<i>Chloroflexi</i>	Ph	7	7
<i>Nitrospira</i>	Ph	22	22
<i>Cyanobacteria</i>	Ph	2	2
<i>Proteobacteria</i>	Ph	513	521
<i>Alphaproteobacteria</i>	Cl	129	129
<i>Betaproteobacteria</i>	Cl	193	200
<i>Gammaproteobacteria</i>	Cl	101	104
<i>Deltaproteobacteria</i>	Cl	79	77
nerazvrščene		11	11
<i>Firmicutes</i>	Ph	34	40
<i>Clostridia</i>	Cl	4	8
<i>Bacilli</i>	Cl	30	32
<i>Actinobacteria</i>	Ph	27	29
<i>Actinobacteria</i>	Cl	27	29
<i>Planctomycetes</i>	Ph	10	9
<i>Spirochaetes</i>	Ph	2	2
<i>Acidobacteria</i>	Ph	8	8
<i>Bacteroidetes</i>	Ph	40	52
<i>Bacteroidetes</i>	Cl	1	7
<i>Flavobacteria</i>	Cl	6	6
<i>Sphingobacteria</i>	Cl	21	24
nerazvrščeni		12	15
<i>Fusobacteria</i>	Ph	1	1
<i>Verrucomicrobia</i>	Ph	3	3
<i>Gemmatimonadetes</i>	Ph	6	6
<i>Lentisphaerae</i>	Ph	2	2
gis OP11	Ph	4	3
gis WS3	Ph	2	2
nerazvrščeni iz Domene		87	82
<i>Bacteria</i>			

4.5.2 Virtualni PCR

Povprečna dolžina v bazi deponirane sekvence s tarčnima zaporedjema za oba začetna oligonukleotida je bila dolga 1403,55 bp (razpon 1287 do 1534, mediana 1394 bp), povprečna dolžina popolnega *in silico* PCR-pomnožka pa 1380,85 bp (razpon 1281 do 1424 bp, mediana 1383 bp). **Preglednica 15** prikazuje število sekvenc v bazi podatkov; število zadetkov iskanja; število sekvenc z vsaj enim tarčnim zaporedjem (=število *in silico* PCR-pomnožkov); število sekvenc s tarčnima zaporedjema za fD1 in 1401r (=število popolnih *in silico* PCR-pomnožkov); sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za fD1 in ne tudi za 1401r ter število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za 1401r in ne tudi za fD1; število sekvenc s tarčnim zaporedjem za fD1 (1401r) ter pripadajoče odstotke.

Preglednica 15: Število sekvenc v bazi podatkov, število zadetkov iskanja in število sekvenc z vsaj enim tarčnim zaporedjem (*in silico* PCR-pomnožkov); število sekvenc s tarčnima zaporedjema za fD1 in 1401r (=število popolnih *in silico* PCR-pomnožkov); število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za fD1 in ne tudi za 1401r ter število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje zgolj za 1401r in ne tudi za fD1 ter število sekvenc, ki imajo tarčno zaporedje za fD1 (1401r) ali oba začetna oligonukleotida in pripadajoči odstotki

		Odstotek med pomnoženimi sekvencami	Odsotek med zadetki
Število sekvenc v bazi podatkov	84155	/	/
Število zadetkov iskanja	770	/	/
N	250	100	32,47
N_{fD1}	148	59,20	19,22
N_{1401r}	16	6,40	2,08
$N_{fD1/1401r}$	86	34,40	11,17
N'_{fD1}	234	93,60	30,39
N'_{1401r}	102	40,80	13,25

N ... število sekvenc z vsaj enim tarčnim zaporedjem (*in silico* PCR-pomnožkov); $N = N_{fD1/1401r} + N_{fD1} + N_{1401r}$

$N_{fD1/1401r}$... število sekvenc s tarčnima zaporedjema za fD1 in 1401r (popolnih *in silico* PCR-pomnožkov)

N_{fD1} ... število sekvenc s tarčnim zaporedjem zgolj za fD1

N_{1401r} ... število sekvenc s tarčnim zaporedjem zgolj za 1401r

N'_{fD1} ... število sekvenc s tarčnim zaporedjem za fD1; $N'_{fD1} = N_{fD1} + N_{fD1/1401r}$

N'_{1401r} ... število sekvenc s tarčnim zaporedjem za 1401r; $N'_{1401r} = N_{1401r} + N_{fD1/1401r}$

Med zadetki iskanja je program FastPCR našel 250 ali slabo tretjino takih sekvenc, ki so imele tarčno mesto za enega ali oba začetna oligonukleotida. Med temi 250-imi je imelo tarčno zaporedje za fD1 (1401r) 93,60 % (40,80 %) *in silico* PCR-pomnožkov oz. 30,39 % (13,25 %) zadetkov iskanja. Zgolj za fD1 (1401r) je imelo tarčno zaporedje 59,20 % (6,40 %) *in silico* PCR-pomnožkov oziroma 19,22 % (2,08 %) zadetkov iskanja. Popolnih PCR-pomnožkov je bilo 86 ali dobra tretjina *in silico* PCR-pomnožkov oziroma dobra desetina zadetkov iskanja. Popolni pomnožki so predstavljali 36,75 % sekvenc s tarčnim zaporedjem za fD1 in 84,31 % sekvenc s tarčnim zaporedjem za 1401r.

4.5.3 Virtualna restrikcijska analiza

Vsi prikazani rezultati se nanašajo na 86 sekvenc, pri katerih smo s FastPCR odkrili tarčni zaporedji za oba začetna nukleotida. V **Preglednici 16** navajamo število in odstotek edinstvenih, needinstvenih in ničelnih profilov restrikcijskih mest po virtualni restrikciji popolnih *in silico* PCR-pomnožkov z eno, dvema, tremi ali štirimi restriktazami.

Preglednica 16: Število in odstotek edinstvenih (EP), needinstvenih (NP) in ničelnih (NiP) profilov restrikcijskih mest po virtualni restrikciji popolnih *in silico* PCR-pomnožkov z eno, dvema, tremi ali štirimi restriktazami.

Restriktaza ali kombinacija restriktaz ¹	Profili restrikcijskih mest ²		EP		NP		NiP	
	Število	[%]	Število	[%]	Število	[%]	Število	[%]
<i>AvaII</i>	71	82,56	66	76,74	5	5,81	11	12,79
<i>HaeIII</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>HhaI</i>	84	97,67	82	95,35	2	2,33	0	0,00
<i>Sau3AI</i>	84	97,67	82	95,35	2	2,33	0	0,00
<i>AvaII+HaeIII</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>AvaII+HhaI</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>AvaII+Sau3AI</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>HaeIII+HhaI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00
<i>HaeIII+Sau3AI</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>HhaI+Sau3AI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00
<i>AvaII+HaeIII+HhaI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00
<i>AvaII+HaeIII+Sau3AI</i>	85	98,84	84	97,67	1	1,16	0	0,00
<i>AvaII+HhaI+Sau3AI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00
<i>HaeIII+HhaI+Sau3AI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00
<i>AvaII+HaeIII+HhaI+Sau3AI</i>	86	100	86	100	0	0,00	0	0,00

¹Pomeni pogostnost pojavljanja oligonukleotidnih zaporedij GGWCC (W=A ali T), GGCC, GCGC in GATC (glej 3.8.3) in ni nujno vezano na omenjene encime.

²Skupno število različnih profilov restrikcijskih mest.

Največje število različnih profilov restrikcijskih mest, ki je kar enako številu EP, je nastalo pri restrikciji s paroma *HaeIII*+*HhaI* in *HhaI*+*Sau3AI*, trojicah *AvaII*+*HaeIII*+*HhaI* in *AvaII*+*HhaI*+*Sau3AI* ter četverici, najmanjše pa pri restrikciji z *AvaII*, ki dà tudi najmanjše število EP in največje število NiP. Povprečno število restrikcijskih mest za *AvaII*, *HaeIII*, *HhaI* in *Sau3AI* je 1'85, 8'17, 4'50 in 4'48 (ni prikazano).

4.6 ARDRA

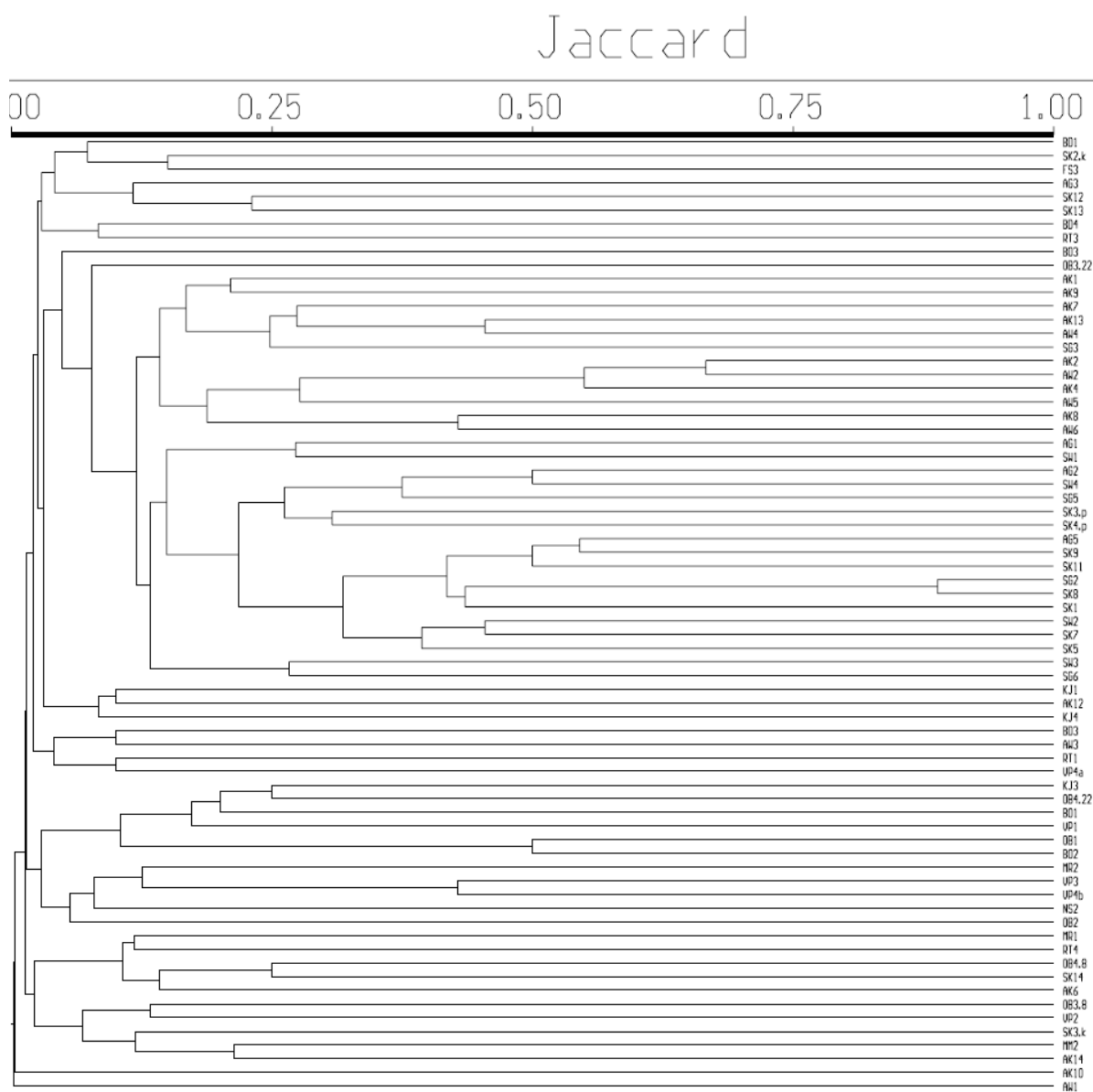
4.6.1 Obdelava restrikcijskih profilov

Pri izdelavi prvotne matrike (velikost $i_0 \times j_0$ v razdelku 3.7.4) smo upoštevali vse fragmente, ki jih je zaznal in navedel Agilent 2100 bioanalyzer. Velikost prvotne matrike je bila tako 305×77. Iz podatkov o dolžini in molarni koncentraciji fragmentov nekaterih izolatov smo posumili na nepopolne restrikcije, mešane vzorce ali kontaminacijo. Spremenili smo izbor izolatov: izločili smo izolate brez pozitivnega elektroforetskega signala; izolate, pri katerih iz elektroferogramov ni bilo moč razločiti signalov fragmentov od ozadja ter izolate, pri katerih je vsota dolžin fragmentov (ob upoštevanju koncentracije) močno presegla 1,3-1,5 kbp, to je pričakovano dolžino PCR-produkta. Prvotno matriko smo tako spremenili v matriko velikosti 209×70 ($i_1 \times j_1$ v razdelku 3.7.4), ki smo jo obdelali s programskim paketom NTSYS-pc v1.8. **Slika 11** prikazuje dendrogram spremenjene matrike z upoštevanjem Jaccardovega koeficienta.

Na podlagi dendrograma smo lahko izolate združili v osem skupin. Dve največji sta vsebovali več kot polovico obravnavanih izolatov. Obe sta združevali izključno morske ali izključno bayerske izolate. Naslednje tri največje skupine so zajele še dodatnih 30 % izolatov; tako je pet največjih skupin zajelo 90 % obravnavanih izolatov, preostanek pa se je razdelil med dva para

in tri posamezne veje. Največjo skupino smo lahko dalje delili v dve podskupini: v **A1** so prevladovali (92 %) izolati z gojišč z umetno morskovo vodo, v **A2** pa izolati z gojišč z morskovo vodo (81 %). Zasledili smo torej razlike v ARDRA-profilih med izolati, ki so zrasli na gojišču z ASW in tistimi, ki so zrasli na gojiščih s SW.

Tako prvotna kot spremenjena matrika sta razlikovali med dolžinami restrikcijskih fragmentov; razlike so bile v okviru analitske napake oz. ločljivosti testa Agilent DNA 1000 Assay, to je ± 5 bp za velikostno območje 25-100 bp, ± 5 % za velikostno območje 100-500 bp in ± 10 % za velikostno območje 500-1000 bp (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, ZDA). Restrikcijske profile smo se odločili primerjati še ročno.



Slika 11: Dendrogram za 70 sedimentnih izolatov, narejen s programskim paketom NTSYS-pc v1.8; za izdelavo matrike podobnosti je bil uporabljen Jaccardov koeficient

Tako smo morske in sladkovodne izolate na podlagi subjektivno ugotovljene podobnosti restrikcijskih profilov razporedili v 13 skupin, ki jih prikazuje **Preglednica 17**. **Sliki 12ab** prikazujeta elektroferograma, normirana gela in preglednici dolžin restrikcijskih fragmentov

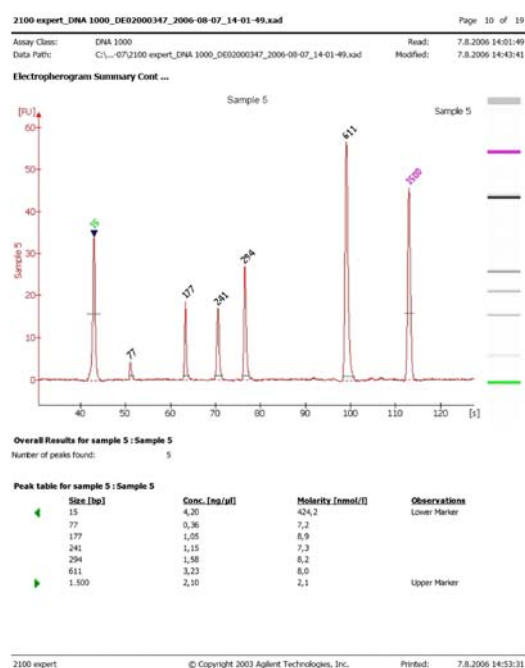
za izolata VP3(22) in VP4b(22) (oba LB) iz skupine **V**. Slike elektroferogramov, normiranih gelov in preglednic dolžin fragmentov restrikcijskih profilov po dveh izolatov iz skupin **I-XI** so prikazane v **Prilogah A-K**.

Preglednica 17: Skupine izolatov glede na restrikcijske profile PCR-pomnožkov 16S rDNK z oligonukleotidnim parom fD1/1401r. V skupino **Ind** smo uvrstili med seboj različne izolate, ki jih ni bilo mogoče uvrstiti v nobeno od skupin **I-XI** in smo jih obravnavali ločeno, v skupino **N** pa izolate, pri katerih z Agilent 2100 bioanalizerjem nismo dobili elektroforetskega signala.

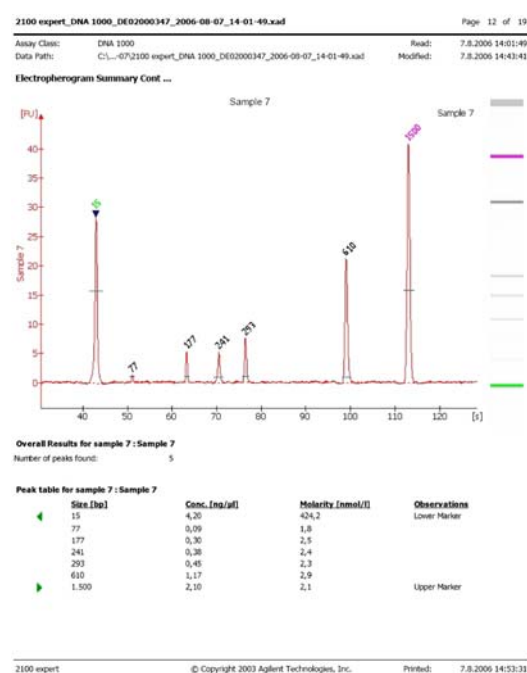
Skupina	Izolati	Skupina	Izolati
I	SW 1, 2, 3, 4	VII	VP2(22) LB
	SWG 2, 5		ASWK 6
	SWK 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 13	VIII	OB3(22) LB
	ASW 2, 4, 6		RT1(22) LB
	ASWG 1, 2, 5		
	ASWK 1, 2, 4, 13	IX	KJ4(22) LB
II	<u>OB1(22) LB</u>		MR1(22) LB
	KJ3(22) LB	X	BD1(22) LB
	MR2(22) LB		RT4(22) LB
	OB3(8) LB	XI	BO3(22) LB
	OB4(8) LB		SK2(22) LB
	BO2(22) M9+Glc	Ind	KJ1(22) LB
III	MM2(22) M9+Glc		OB2(22) LB
	<u>ASWK14</u>		OB4(22) LB
	VP1(22) LB		RT3(22) LB
	BO1(22) M9+Glc		SK3(22) LB
IV	ASWK 10		FS3(22) M9+Glc
	BD3(22) LB		ASW 1
	NS2(22) LB		ASW 3
V	VP3(22) LB	N	BD2(22) LB
	VP4a(22) LB		MR4(22) LB
	VP4b(22) LB		NS2(22) LB
VI	SWG 3		SK4(22) LB
	SWK 13		FS1(22) M9+Glc
	ASWG 3		FS2(22) M9+Glc

Črta ločuje izolate, ki jih je bilo moč dalje združiti v podskupine. Tako skupino **II** sestavljata dve podskupini z enim in petimi člani, skupino **III** pa dve podskupini s po dvema članoma. Pri nekaterih izolatih je bil seštevek

dolžin restrikcijskih fragmentov daljši od 1,3-1,5 kbp in je lahko posledica mešane kulture ali več kot enega (edinstvenega) zaporedja 16S rDNK v enem mikroorganizmu (torej več kot en operon za rRNK) (Chandler in sod, 1997).



(a)



(b)

Slika 12ab. Elektroferograma, normirana gela in preglednici dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata (a) VP3(22) LB in (b) VP4b(22) LB iz skupine V.

Na podlagi profila dolžin restrikcijskih fragmentov smo 62 izolatov (od skupno 77; 80,52 %) razporedili v 13 skupin. V skupino N smo uvrstili 6 - izključno koseških - izolatov (9,67 % od 62; 7,79 % od 77), pri katerih nismo dobili elektroforetskega signala pri analizi restrikcijskih fragmentov. Glede na uspešnost izolacije DNK in pomnoževanja s PCR (fD1/1401r) smo jih dalje združili v podskupine: v podskupini **N.A** sta izolata, pri katerih sta bila tako izolacija DNK kot tudi PCR neuspešna (MR4(22) LB, NS1(22) LB), v **N.B** izolata, pri katerih je uspela izolacija DNK, PCR pa ne (SK4(22) LB, FS1(22) M9+Glc), v **N.C** pa izolat, pri katerem sta izolacija in PCR uspela (FS2(22) LB).

Restriksijski profili šestih koseških (KJ1(22); OB2,4(22), RT3(22); SK3(22) (vsi LB) in FS3(22) M9+Glc) in dveh piranskih izolatov (ASW1, 3) (skupno 12,90 % od 62, 10,39 % od 77) se razlikujejo tako med seboj kot tudi od profilov ostalih 11 skupin. Izolate smo uvrstili v samostojno skupino **Ind**. Če izvzamemo skupini **Ind** in **N**, lahko dve tretjini izolatov razvrstimo v tri največje skupine in še 16 % izolatov v naslednje tri skupine.

Skupina **I** združuje 26 ali 41,94 % (33,77 % od 77) - izključno morskih – izolatov. Druga največja skupina (**II**) združuje šest koseških izolatov. Restriksijski profili kažejo, da jo je moč razdeliti na dve podskupini: v **II.A** je OB1(22) LB, v **II.B** pa preostalih pet izolatov. Skupina **III** poleg treh koseških (MM2(22), BO1(22) (oba M9+Glc) in VP1(22) LB) vsebuje tudi piranski izolat, ASWK14. Skupino **III** smo razdelili na dve podskupini s po dvema članoma: **III.A** z MM2(22) M9+Glc in ASWK14 ter **III.B** z BO1(22) M9+Glc in VP1(22) LB. Skupine **IV-VI** so trojice. V skupino **IV** smo uvrstili piranski (ASWK10) in dva koseška izolata (BD3(22), NS2(22), oba LB). Poleg podobnosti ARDRA-profilov so si izolati, uvrščeni v skupino **V**, podobni tudi po rezultatih fenotipskih testov (glej **Preglednico 10**). Pregled dendrograma (Jaccardov koeficient) (**Slika 11**) je nakazal, da sta si podobnejša VP3(22) in VP4b(22), medtem ko naj bi bil VP4a(22) podobnejši RT1(22) (vsi LB). V skupini **VI** so piranski izolati SWG3, SWK13 in ASWG3. Skupina **VII** je par VP2(22) LB in ASWK6. Skupine **VIII-XI** so pari koseških izolatov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z molekularnimi in nekaterimi preprostejšimi fenotipskimi metodami smo skušali opredeliti izolate iz morskih in sladkovodnih sedimentov ter tako opisati pestrost tistega dela sedimentne mikrobiote, ki ga lahko (vz)gojimo v laboratorijskih razmerah. Z ekosistemoma se mikrobiološko šele spoznavamo, zato je bilo preučevanje presejalnega značaja.

Morske in sladkovodne sedimente smo vzorčili v oktobru. Vzorce sedimentov iz Piranskega zaliva, kopališča ob strunjanskem pomolu in blato z dna Strunjanskega potoka v Strunjanskih solinah blizu zaliva Sv. Duha smo nacepili na šest različnih agariziranih oligotrofnih gojišč; pri treh je bila osnova morska voda, pri treh pa umetna morska voda (Köpke in sod., 2005). Vzorce sedimentov iz Koseškega bajerja smo nacepili na dve različni, pogosto uporabljeni trdni gojišči, LB in M9 z glukozo. Da bi omilili ali se izognili morebitnemu substratnemu šoku (Straskrbova, 1983; cit. po Köpke in sod., 2005), je bila koncentracija vira ogljika (glukoza ali kazein) pri gojenju morskih izolatov nizka (0,2 g/l).

Zastavlja se vprašanje, ali je bila izbira oligotrofnih gojišč za izolacijo in gojenje morskih sedimentnih mikroorganizmov utemeljena. Piranski in Tržaški zaliv namreč spadata med priobalna področja, za katera je znano, da prejemajo velike količine z dušikom, fosforjem in mikronutrienti bogate organske snovi (Dell'Anno in sod., 2002; Zimmerman in sod., 2002; Bouillon in Boschker, 2005), ta pa spodbudi povečano primarno produkcijo. Posledično celokupna količina organske snovi, ki doseže bentos/sediment, presega tako dejansko kot potencialno razgrajevalno sposobnost sedimentne biote (Nealson, 1997). Iz ugotovitev, da je bistvenega pomena v zgodnji diagenezi in tudi količini organske snovi, ki doseže globlje plasti sedimenta ali se trajno deponira, ravno aerobna razgradnja - ta pa je odvisna od difuzije kisika in hitrosti respiracije ter omejena na vrhnji sloj - izluščimo, da je kisik pri dnu kmalu izčrpan. Nastopita najprej hipoksija (konc. $O_2 < 2$ ml/l) in nato anoksija. V Tržaškem zalivu tudi

prihaja zaradi temperaturnih razlik in torej zaradi razlik v gostoti vode do stratifikacije vodnega stolpa, ki prepreči mešanje površinske in bentoške vode. To še dodatno pripomore k zmanjšanju koncentracije kisika pri dnu, ki se zato hitro porabi, razgradnja organske snovi - glavnega donorja elektronov v številnih sedimentnih okoljih - pa poteka anaerobno. Ker je tovrstni način zaradi manjšega izkoristka energije počasnejši, tudi prispeva k "zastajanju" ali humifikaciji organske snovi v sedimentu. Oligotrofi zato morda niso reprezentativni za celotno ali kultivabilno mikrobioto. Zanimivo pa bi bilo izvedeti, kakšno je razmerje med preferenčno oligotrofnimi in preferenčno kopiotrofnimi mikroorganizmi ter vsaj nakazati odgovore na pogosta mikrobnoekološka vprašanja o zvezi med strukturo in funkcijo.

Po nekajtedenskem precepljanju izoliranih bakterijskih sevov smo domnevno čiste kulture barvali po Gramu, nekatere tudi po Schaeffer in Fultonu (1933) (glej tudi Mormak in Cassida, 1985). Pri koseških sevih smo izvedli še katalazni test ter test s 3-odstotnim KOH. S slednjim je Buck (1982) lahko nedvoumno razlikoval med gramnegativnimi in grampozitivnimi kulturami bakterij, izoliranimi iz morske vode in rib. Moaledj (1986) na aerobnih izolatih iz različnih globin vodnega stolpa evtrofnega jezera ni dokazal popolne korelacije med gramskim barvanjem in KOH-testom, čemur pritrjujemo: razen enega primera (SK4(22) LB) je bil KOH-test pri gramnegativnih bakterijah negativen, pri sedmih grampozitivnih pa pozitiven. Metoda ne omogoča razlikovanja bakterij, ki se barvajo po Gramu variabilno, kar smo ugotovili tudi sami – KOH-test vseh gramsko variabilnih izolatov je bil negativen. Uporabnost omenjenega testa in barvanja po Gramu na nepoznanih (ali slabo poznanih) in nekarakteriziranih okoljskih vzorcih je tako omejena.

Glavnina dela je temeljila na genotipski karakterizaciji izolatov. Odločili smo se za tipizacijo na podlagi podobnosti profilov dolžin restrikcijskih fragmentov (dalje ARDRA-profilov) v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnožene 16S rDNK. Pri pomnoževanju smo uporabili štiri pare začetnih oligonukleotidov: fD1, Eub338f, 1392r in 1401r. Njihovo specifičnost smo ugotavljali preko odstotka, ki ga v bazi RDP II.9 med kvalitetnimi deponiranimi sekvencami ≥ 1200 bp (skupaj 95353 ali skoraj 40 % celotne baze) predstavljajo tiste s tarčnim zaporedjem

za izbrani oligonukleotid. Ugotovili smo, da smo dosegli več kot 90-odstotno pokritost nabora sekvenc z Eub338f (ne glede na število dopuščenih neujemanj), medtem ko je fD1, če smo zahtevali popolno ujemanje tarčnega in iskalnega zaporedja, odkril le dobro desetino nabora, pri dopuščenih treh neujemanjih pa še vedno manj kot tretjino. fD1 na 16S rDNK nalega na skrajnem 5'-koncu, zato ta regija pogosto ni zajeta pri sekvenciranju, če je le-to opravljeno le v smeri 5'-3'. Za restrikcijsko analizo izolatov, katerih 16S rDNK smo uspeli pomnožiti z oligonukleotidnim parom fD1/1401r, smo se odločili, ker smo z njim uspeli pomnožiti največji delež tako morskih kot bajerskih izolatov.

Pri izbiri restriktaz smo ubrali virtualno pot: z virtualnim PCR in oligonukleotidnim parom fD1/1401r smo pomnožili 770 zadetkov iskanja po celotni bazi RDPII.9 z geslom *freshwater sediment*, nato dobljenih 250 *in silico* PCR-pomnožkov virtualno v ločenih »reakcijah« razrezali s štirimi različnimi restrikcijskimi encimi (*AvaII*, *HaeIII*, *HhaI* in *Sau3AI*) ter ugotovili število in odstotek edinstvenih (EP), needinstvenih (NP) in ničelnih (NiP) profilov restrikcijskih mest.

Izbiri restriktaz oziroma preskok iz virtualne v laboratorijsko realnost smo delno utemeljili z izbiro encima ali encimov, ki dà največje število EP ali najmanjše število NP pri najmanjšem številu uporabljenih encimov, to je pri parih *HaeIII*+*HhaI* ter *HhaI*+*Sau3AI*. Virtualna restrikcijska analiza je tudi pokazala, da je število restrikcijskih mest *HaeIII* skoraj dvakrat večje od števila restrikcijskih mesta *HhaI*. Zato bi z uporabo para *HaeIII*+*HhaI* tako dosegli večjo ločljivost v primerjavi s parom *HhaI*+*Sau3AI*.

Pri analizi rezultatov restrikcijskih profilov nekaterih izolatov smo zaradi neoptimiranosti postopkov naleteli na težave. Tako prvotna kot spremenjena matrika, v katerih smo dolžine restrikcijskih fragmentov povezali z izolati, pri katerih so se pojavili, sta bili obsežni (305×77 oz. 209×70), rezultati njune obdelave v NTSYS-pc v1.8. pa nejasni in premalo informativni. V končni fazi smo profile v skupine združevali ročno. V nadaljevanju sledijo rezultati in ugotovitve.

O razporeditvi restrikcijskih mest profil dolžin restrikcijskih fragmentov, ki je rezultat ARDRA, ne pove dosti. Prav na podlagi profila dolžin pa smo 62 izolatov (od skupno 77; 80,52 %) razporedili v 13 skupin. V 15 primerih (19,48 %) je vsota dolžin restrikcijskih fragmentov presegla 1,3-1,5 kbp. Posumili smo na prisotnost več kot enega tipa PCR-pomnožka, ki ji je vzrok lahko mešana kultura, naknadna kontaminacija ali prisotnost več kot ene edinstvene 16S rDNK v eni celici (Chandler in sod., 1997; Nübel in sod, 1996). Teh 15 izolatov smo izločili.

Podrobnejši pregled elektroferogramov analize restrikcijskih fragmentov je pokazal na morebitno prisotnost dveh ali več tipov PCR-pomnožkov. Res, pri nekaterih izolatih so našo pozornost pritegnile dodatne proge tik ob progi domnevnega pomnožka ali na višini približno dvakratne dolžine domnevnega pomnožka; za slednje smo sklepali, da so multimerni artefakti pomnoževanja.

V skupino **N** smo uvrstili 6 - izključno koseških - izolatov (9,67 % od 62; 7,79 % od 77), pri katerih nismo dobili pozitivnega elektroforetskega signala pri analizi restrikcijskih fragmentov. Glede na uspešnost izolacije DNK in pomnoževanja s PCR (fD1/1401r) smo jih dalje združili v štiri podskupine. Odsotnost elektroforetskega signala pri MR4(22) LB in NS1(22) lahko razložimo z neuspešnostjo izolacije DNK in zato PCR-pomnoževanja; pri SK4(22) LB in FS1(22) M9+Glc z neuspešnim PCR-pomnoževanjem, pri FS2(22) LB pa z odsotnostjo restrikcijskih mest v pomnožku ali izgubo materiala pri čiščenju PCR-pomnožkov z etanolno precipitacijo.

Restrikcijski profili šestih koseških (KJ1(22); OB2,4(22), RT3(22); SK3(22) (vsi LB) in FS3(22) M9+Glc) in dveh morskih izolatov (ASW 1, 3) (skupno 12,90 % od 62, 10,39 % od 77) imajo dve značilnosti, na podlagi katerih smo jih uvrstili v samostojno skupino **Ind**: med seboj so si različni in nismo jih mogli uvrstiti v nobeno od skupin **I-XI**. V nadaljevanju obravnavamo le skupine **I-XI**.

Večino (8 od 11) skupin tvorijo izključno koseški ali izključno morski sedimentni izolati. V treh mešanih skupinah (**III**, **IV**, **VII**) je bil po en morski izolat, pridobljen iz desetkrat redčenega alikvota sedimentnega vzorca iz Strunjanskega kopališča (**III**), neredčenega alikvota zgornjega (**VII**) oz. spodnjega (**VI**) sloja sredice 1. Vsi so zrasli na ASW+Kaz.

Skupina **I** združuje 26 ali 41,94 % (33,77 % od 77) - izključno morskih - izolatov. Zanimivo je, da so ti z vseh šestih gojišč, tako s SW kot z modificiranega ASW. Z uporabo različnih osnovnih gojišč nam torej ni uspelo izolirati raznolikih skupin aerobnih, večinoma kemoorganotrofnih, mikroorganizmov iz morskih sedimentov. Ugotovili pa smo, da so po restriksijskih profilih podobni izolati metabolno raznoliki - med izolati so tako kemoorganotrofi kot tudi kemolitotrofi (ASW 2, 4, 6). Med kemoorganotrofi prevladujejo izolati z domnevno proteolitično aktivnostjo (ASWK in SWK), takih je 14 (56,00 % članov skupine **I**). Nekatere izmed izolatov smo v izhodišču izbrali zaradi izkazane agarolitične aktivnosti; v skupini **I** je takih šest (23,08 % članov skupine **I**). Od teh smo štiri izolirali na gojiščih SW in SW Kaz, po enega pa na ASW Glc in ASW Kaz. Polovica agarolitičnih izolatov skupine **I** izvira iz zgornjega sloja sredice 1.

Druga največja skupina (**II**) združuje šest koseških izolatov. RFLP-profil kaže, da jo je moč razdeliti na dve podskupini: v **II.A** je OB1(22) LB, v **II.B** pa KJ3(22), MR2(22), OB3,4(8) (vsi LB) ter BO2(22) M9+Glc. Argument za delitev je prisotnost dodatnega fragmenta z dolžino 177 bp pri OB1(22) LB, ki je pri ostalih izolatih odsoten. Izolati se barvajo po Gramu pozitivno, katalazni test je pri OB4(8) LB negativen, pri BO2(22) M9+Glc šibko pozitiven in pri ostalih pozitiven. KOH-test je pri vseh negativen.

Skupina **III** je ena izmed treh "mešanih" skupin - poleg treh koseških (MM2(22), BO1(22) (oba M9+Glc) in VP1(22) LB) vsebuje tudi piranski izolat, ASWK14. Skupino **III** smo razdelili na dve podskupini s po dvema članoma: **III.A** z MM2(22) M9+Glc in ASWK14 ter **III.B** z BO1(22) M9+Glc in VP1(22) LB. MM2(22) M9+Glc je eden izmed štirih gramnegativnih izolatov, toda KOH-test je ravno tako negativen (katalaza šibko pozitivna),

kot pri BO1(22) M9+Glc, ki se barva gramsko variabilno (katalaza pozitivna). Pri VP1(22) LB so rezultati vseh testov pozitivni.

Skupine **IV-VI** so trojice. V skupino **IV** smo uvrstili piranski (ASWK 10) in dva koseška izolata (BD3(22), NS2(22), oba LB), ki sta skladna tudi glede na gramsko barvanje (+) in katalazni test (+) Rezultat KOH-testa je pri NS2(22) LB negativen, pri BO3(22) LB pa dvoumen. Skupina **V** je glede na podobnost ARDRA-profilov "najmočnejša", izolati so skladni tudi po gramskem barvanju (+ oz. +/-var), KOH-testu (-) in katalaznem testu (+). V skupini **VI** so piranski izolati SWG3, SWK13 in ASWG3. Skupina **VII** je par VP2(22) LB in ASWK6. Skupine **VIII-XI** so pari koseških izolatov.

Največji delež med izolati imajo tisti, ki se barvajo po gramu pozitivno. Prevladujoči obliki sta paličasta in kijasta.

Tako analiza z NTSYS-pc kot ročna obdelava sekvenc sta pokazali, da so dve največji skupini sestavljali izključno morski oz. izključno bayerski izolati in da je bilo moč večino izolatov pospraviti v nekaj številčnejših skupin, preostale pa pretežno v trojice in pare.

Pomemben vidik na gojenju temeljčnega preučevanja sedimentnih mikroorganizmov je odločitev, ali mikrobne celice ločiti od sedimentnega matriksa. Trenutne metode za ločevanje celic od matriksa so invazivne in grobe. Iz poročila dos Santos Furtado in Casperja (2000) je očiten vpliv trajanja sonikacije in medija, v katerem jo mikroorganizmi vzdržijo. Vendar ne povesta, kako sonikacija vpliva na število celic, ki jih lahko (vz)gojimo; ali tak način obdelave vzorca favorizira izolacijo in gojenje nekaterih mikrobnih skupin. Če gre prenesti njune izsledke (petminutno soniciranje nativnega sedimentnega vzorca je povzročilo zmanjšanje števila celic za skoraj polovico) na vzorce Koseškega bajerja, so petminutno sonikacijo in centrifugiranje preživele le najtrpežnejše in/ali najštevilčnejše celice. Zaradi slabega dosedanjega mikrobiološkega poznavanja ekosistema, ki se s tem delom (še) ne bo izboljšalo, ne moremo reči ničesar o posameznih bioloških entitetah, ki ga sestavljajo in še manj o

interakcijah med njimi.

V sedimentnih vzorcih iz Koseškega bajerja sta nas presenetili tako morfološka pestrost kot tudi raznolikost izolatov glede na ARDRA-profile; iz razmeroma hitre, pri nekaterih tudi agresivne, rasti večine izolatov z LB sklepamo, da gre za mikrobni plevel (»microbial weeds«; Madigan in sod., 2003).

5.2 SKLEPI

Iz vzorcev morskih in sladkovodnih sedimentov smo s kombiniranim pristopom skušali ugotoviti, kakšna je mikrobna pestrost tistega dela aerobne heterotrofne združbe, ki ga lahko v laboratorijskih razmerah (vz)gojimo s tradicionalno mikrobiološko metodo razredčevanja in nacepitve na agarizirana gojišča.

Iz morskega sedimenta smo mikroorganizme z enakim ali zelo podobnimi restrikcijskimi profili med 1,3 in 1,5 kbp dolgega PCR-pomnožka 16S rDNK izolirali na šestih različnih gojiščih. Hkrati smo na enem tipu gojišča izolirali mikroorganizme z različnimi restrikcijskimi profili.

Večina izolatov iz sedimentov Koseškega bajerja se je barvala po Gramu pozitivno ali spremenljivo, bila KOH-negativna in katalaza-pozitivna. Prevladujoči obliki sta bili paličasta in kijasta.

Težave pri izvedbi in dvoumni rezultati omejujejo uporabnost uveljavljenih fenotipskih – četudi le presejalnih - testov na okoljskih vzorcih, še posebno v pionirskih študijah, kjer se z ekosistemom komaj spoznavamo.

Z nobenim parom evolucijsko ohranjenih začetnih oligonukleotidov nismo mogli pomnožiti 16S rDNK vseh izolatov.

In silico ugotovljena specifičnost začetnih oligonukleotidov, katerih tarčna mesta so na skrajnem 5' ali 3' koncu, je odvisna od kakovosti deponiranih sekvenc.

Ugotovili smo, da je ARDRA primeren način za presejalno testiranje sedimentnih izolatov, a zahteva še nekaj optimizacije.

Večino izolatov smo lahko razdelili v nekaj večjih skupin, ostale pa v skupine z manjšim številom članov.

V dveh največjih skupinah so bili izključno morski oz. izključno bajerski izolati.

6 POVZETEK

Preučevali smo pestrost aerobne heterotrofne sladkovodne in morske sedimentne mikrobiote, ki jo lahko izoliramo s tradicionalno mikrobiološko metodo razredčevanja in nacepitve na trdna gojišča ter gojimo v laboratorijskih pogojih.

Poglavitni del informacij smo pridobili z izdelavo restrikcijskih profilov pomnožene 16S rDNK domnevno čistih kultur izolatov, dopolnjujejo pa ga nekatere preprostejše in uveljavljene fenotipske metode.

Skupno smo tako pregledali 77 izolatov, 43 morskih in 34 sladkovodnih. Morske smo izolirali in gojili na šestih različnih agariziranih oligotrofnih gojiščih dveh tipov. Razlika med njima je bila v sestavi osnovnega gojišča (modificirano gojišče z umetno morskovo vodo (ASW; Köpke in sod., 2005) ali sterilizirana morska voda).

Po večkratnem precepljanju smo iz domnevno čistih kultur izolirali genomsko DNK. 16S rDNK smo pomnoževali s štirimi različnimi evlucijsko ohranjenimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi: fD1, Eub338f, 1392r in 1401r (od R-1401 (Nübel in sod, 1996) se razlikuje v dveh nukleotidih). Pomnožke s pričakovanimi dolžinami med 1,3 in 1,5 kbp smo hkrati razrezali z restriktazama *Bsu*RI (GGCC) in *Hha*I (GCGC). Produkta restrikcij smo analizirali s sistemom Agilent 2100 bioanalyzer in obdelali s programom Agilent 2100 expert.

V matriko velikosti 305×77 smo za vsak izolat vnesli velikosti fragmentov. Prvotna matrika je upoštevala vse fragmente. Toda vsota velikosti fragmentov se pri nekaterih izolatih ni skladala z velikostnim območjem pričakovanih PCR-pomnožkov; posumili smo na nepopolne restrikcije, prisotnost več kot enega edinstvenega gena za 16S rRNK v posameznem izolatu, mešano kulturo ali naknadno kontaminacijo. Zmanjšali smo nabor fragmentov in izolatov. Tako je nastala matrika velikosti 209×70.

Ugotovili smo, da se ARDRA-profilu sladkovodnih in morskih izolatov med seboj razlikujejo. Dve največji skupini - tako po analizi z NTSYS-pc v1.8 kot po subjektivni (ročni) primerjavi profilov - sestavljajo izključno morski oz izključno bajerski izolati. Večino izolatov lahko združimo v nekaj večjih skupin, preostale pa v pare in trojice; nekateri tvorijo samostojne linije.

Pri interpretaciji rezultatov in oblikovanju sklepov smo imeli težave zaradi neoptimiranosti postopkov od vzorčenja do ARDRA, posredno pa tudi zaradi nepoznavanja ekosistema.

V odsotnosti sekvenčne informacije ne moremo reči ničesar dokončnega o taksonomski poziciji izolatov.

7 VIRI

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169

Atlas R.M., Bartha R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4th ed. Menlo Park, California; Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: 694 str.

Banjac M. 2003. Primerjava bakterijskih populacij v sedimentih Triglavskih jezer z molekularnimi metodami. Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 63 str.

Black K.S., Tolhurst T.J., Paterson D.M., Hagerthey S.E. 2002. Working with natural cohesive sediments. *Journal of Hydraulic Engineering*, January: 2-8

Bouillon S., Boschker H.T.S. 2005. Bacterial carbon sources in coastal sediments: a review based on stable isotope data of biomarkers. *Biogeosciences Discussions*, 2: 1617-1644

Brinkhoff T., Santegoeds C.M., Sahm K., Kuever J., Muyzer G. 1998. A polyphasic approach to study the diversity and vertical distribution of sulfur-oxidizing *Thiomicrospira* species in coastal sediments of the German Wadden sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 12: 4650-4657

Buck J. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 4: 992-993

Burns D.G., Camakaris H.M., Janssen P.H., Dyall-Smith M.L. 2004. Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiology Letters*, 238: 469-473

Button D.K., Schut F., Quang P., Martin R., Robertson B. 1993. Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures and initial results. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 881-891

Chandler D.P., Li S.-M., Spadoni C.M., Drake G.R., Balkwill D.L., Fredrickson J.K., Brockman F.J. 1997. A molecular comparison of culturable heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 23: 131-144

Chenu C., Stotzky G. 2002. Interactions between microorganisms and soil particles: an overview. V: Soil particles and microorganisms. Huang P.M., Bollag J.-M., Senesi N. (eds.). Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 3-40

CLC bio A/S. 2006. CLC Free Workbench 2.5.1. Aarhus, CLC bio A/S (2006)
<http://www.clcbio.com/index.php?id=479> (28. marec 2006)

Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 1: D294-D296

Connon S.A., Giovannoni S.J. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68,8: 3878-3885

Dell'Anno A., Mei M.L., Pusceddu A., Danovaro R. 2002. Assessing the trophic state of coastal marine systems: a new approach based on the biochemical composition of sediment organic matter. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 611-622

dos Santos Furtado A.L., Casper P. 2000. Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 249-257

Ehrlich H.L. 2002. Geomicrobiology. 4th ed. New York, Marcel Dekker, Inc.: 768 str.

Eisen J.A. 1995. The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 12: 1105-1123

Fajfar N. 2006. Vpliv vrste in koncentracije koloidov na aktivnost bakterij. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 33 str.

Firbas P. 2001. Vsa slovenska jezera. Leksikon slovenskih stoječih voda. Ljubljana, DZS: 3-68, 169-170

Gelsomino A., Cacco G. 2006. Compositional shifts of bacterial groups in a solarized and amended soil as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 91-102

Gich F., Schubert K., Bruns A., Hoffelner H., Overman J. 2005. Specific detection, isolation, and characterization of selected, previously uncultured members of the freshwater bacterioplankton community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 10: 5908-5919

Gray J.P., Herwig R.P. 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 11: 4049-4059

Hines M.E., Faganeli J., Planinc R. 1997. Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom water oxygen depletion. *Biogeochemistry*, 39: 65-86

Hines M.E., Faganeli J., Horvat M. 2001. Methylmercury formation and degradation in sediments of the Gulf of Trieste. *RMZ – Materials and Geoenvironment: periodical for mining, metallurgy and geology* = *RMZ – Materiali in geokolje: revija za rudarstvo, metalurgijo in geologijo*, 48, 1: 157-164

Hugenholtz P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3, 2: reviews0003.1-0003.8
<http://genomebiology.com/2002/3/2/0003> (12. april 2006)

Interaktivni zemljevid Slovenije. 2006. Elektronski telefonski zemljevid Slovenije (ETIS), Ljubljana, Telekom Slovenije (pomlad 2006): CD-ROM

Jørgensen B.B., Gallardo V.A. 1999. *Thioploca* spp.: filamentous sulfur bacteria with nitrate vacuoles. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 301-313

Kalendar R. 2006. FastPCR, PCR primer design, DNA and protein tools, repeats and own database searches program. Helsinki, University of Helsinki. (2006)
www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm (april 2006)

Kemp W.M., Faganeli J., Puškarič S., Smith E.M., Boynton W.R. 1999. Pelagic-benthic coupling and nutrient cycling. V: *Ecosystems at the land-sea margin: drainage basin to coastal sea*. Coastal and Estuarine Studies, 55: 295-339

Köpke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H. 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7819-7830

Koseški bajer. 2006. Ljubljana, Vremenska postaja Ljubljana Koseze (2006).

<http://rth.mine.nu/vreme.koseze/> (avgust 2006): 1 str.

Krivograd Klemenčič A. 2001. Alge posebnih okolij v Sloveniji. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 160 str.

Krivograd Klemenčič A. 2002. Alge Koseškega bajerja in Sotelskega jezera, dveh evtrofnih jezer v Sloveniji. *Natura Sloveniae*, 4, 2: 5-19

Kučina M., Studen M., Černe J., Kobe T., Savkovič R., Rožkar P. 2000. Koseški bajer. Ljubljana, BRUTO Landscape Architecture & Design (2000)

<http://www.bruto.si/slo/?m=5&p=46&pic=751> (avgust 2006): 1 str.

Li W.-H., Graur D. 1991. Fundamentals of molecular evolution. ZDA, Massachusetts, Sunderland, Sinauer Associates, Inc.: 284 str.

Litchfield C.D., Floodgate G.D. 1975. Biochemistry and microbiology of some Irish Sea sediments: II. Bacteriological analyses. *Marine Biology*, 30: 97-103

Lojen S., Ogrinc N., Dolenc T. 1999. Decomposition of sedimentary organic matter and methane formation in the recent sediment of Lake Bled (Slovenia). *Chemical Geology*, 159, 1: 223-240

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New Jersey, Pearson Education, Inc.: 1019 str.

Malhotra A. 2001. rRNA structure. V: Encyclopedia of life sciences. Cox M. (ed.). John Wiley & Sons Ltd. (31. maj 2001)

<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/047001590X/els/article/a0000537/current/pdf> (september 2006): 12 str.

Marsh T.L., Saxman P., Cole J., Tiedje J. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66,8: 3616-3620

Moaledj K. 1986. Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 5: 303-310

Molecular cloning: a laboratory manual. 2001. Sambrook J., Russell D.W. (eds.) 3rd ed. New York, Cold Spring Harbor Press: loč. pag.

Mormak D.A., Cassida L.E. jr. 1985. Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 6: 356-1360

MBP Piran. 2006. Oprema. Piran, Morska biološka postaja Piran (2006)

<http://portal.mbss.org/portal.php?do=oprema2> (21. avgust 2006): 1 str.

Muyzer G. in Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141

Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317-322

Nealson K. H. 1997. Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 25: 403-434

Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Wieshuber A., Amann R., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 19: 5636-5643

Pramer D. 1957. The influence of physical and chemical factors on the preparation of silica gel media. *Applied Microbiology*, 5, 6: 392-395

Reeves R.H., Reeves J.Y., Balkwill D.L. 1995. Strategies for phylogenetic characterization of subsurface bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 21: 235-251

Rohlf F.J. 1993. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80 (Exeter software). New York, Applied Biostatistics Inc.

Schaeffer A.B., Fulton M.D. 1933. A simplified method of staining endospores. *Science*, 77:194

Schultz H.N., Brinkhoff T., Ferdelman T.G., Marine M.H., Teske A., Jørgensen B.B. 1999. Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments. *Science*, 284: 493-495

Schlesinger W.H. 1997. Biogeochemistry: an analysis of global change. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 588 str.

Sneath P.H.A., Sokal R.R. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco, Freeman: 573 str. Cit. po Rohlf F.J. 1993. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80 (Exeter software). New York, Applied Biostatistics Inc.: loč. pag.

Spring S., Schulze R., Overmann J., Schleifer K.-H. 2000. Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 573-590

Smithson P., Addison K., Atkinson K. 2002. Fundamentals of the physical environment. 3rd ed. London, Routledge: 627 str.

Straskrabova V. 1983. The effect of substrate shock on populations of starving bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 217-224. Cit. po Köpke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H. 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7819-7830

Tamaki H., Sekiguchi Y., Hanada S., Nakamura K., Nomura N., Matsumura M., Kamagata. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4: 2162-2169

Thaler V. 2006. Koseze danes. Ljubljana, Turistično društvo Koseze. (2006)
<http://www.td-koseze.si/index.php?psid=danes/kdl> (avgust 2006): 1 str.

Thar R., Kühl M. 2002. Conspicuous veils formed by vibrioid bacteria on sulfidic marine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 6310-6320

Torsvik V., Sørheim R., Goksøyr J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 170-178

Wagner M., Horn M., Daims H. 2003. Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 302-307

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 2: 697-703

Wheeler Alm E., Oerther D.B., Larsen N., Stahl D.A., Raskin L. 1996. The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 10: 3557-3559

Woese C.R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 15: 8392-8396

Zengler K., Toledo G., Rappé M., Elkins J., Mathue E.J., Short J.M., Keller M. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 24: 15681-15686

Zimmerman A.R., Canuel E.A. 2002. Sediment geochemical records of eutrophication in the mesohaline Chesapeake bay. *Limnology and Oceanography*, 47, 4: 1084-1093

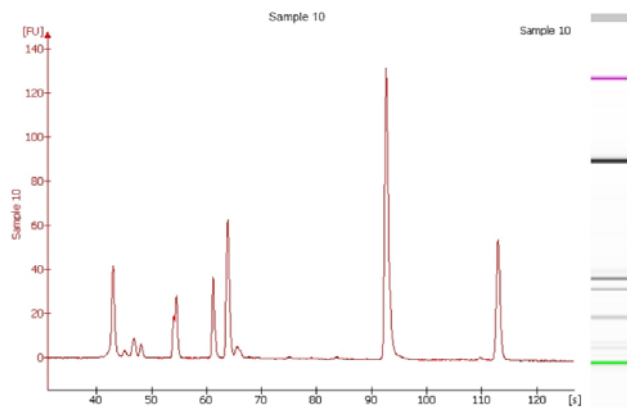
ZAHVALE

ISKRENA HVALA VSEM!

PRILOGE: Elektroferogrami, normirani geli in preglednice dolžin restrikcijskih fragmentov za posamezne izolate iz skupin **I-XI**

- Priloga A:** Skupina **I** (ASWG5 in SW2)
- Priloga B:** Skupina **II** (OB1(22) LB in BO2(22) M9+Glc)
- Priloga C:** Skupina **III** (ASWK14 in VP1(22) LB)
- Priloga D:** Skupina **IV** (ASWK10 in NS2(22) LB)
- Priloga E:** Skupina **V** (VP3(22) LB in VP4b(22) LB)
- Priloga F:** Skupina **VI** (SWK13 in ASWG5)
- Priloga G:** Skupina **VII** (VP2(22) LB in ASWK6)
- Priloga H:** Skupina **VIII** (OB3(22) LB in RT1(22) LB)
- Priloga I:** Skupina **IX** (KJ4 (422) LB in MR1(22) LB)
- Priloga J:** Skupina **X** (BD1(22) LB in RT4(22) LB)
- Priloga K:** Skupina **XI** (BO3(22) LB in SK2(22) LB)

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 10 : Sample 10

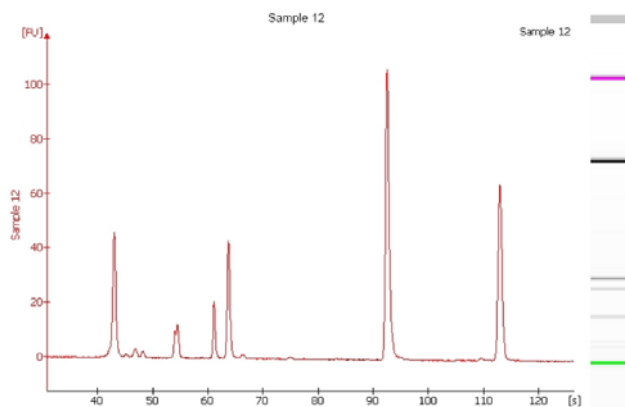
Number of peaks found: 9

Peak table for sample 10 : Sample 10

Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,44	27,8	
41	1,94	38,4	
54	0,50	14,1	
100	1,01	15,3	
104	1,62	23,6	
157	1,99	19,2	
181	4,09	34,4	
196	0,44	3,4	
482	5,55	20,6	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga A: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata ASWG5 (zgoraj) in SW2 (spodaj) iz skupine I.

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 12 : Sample 12

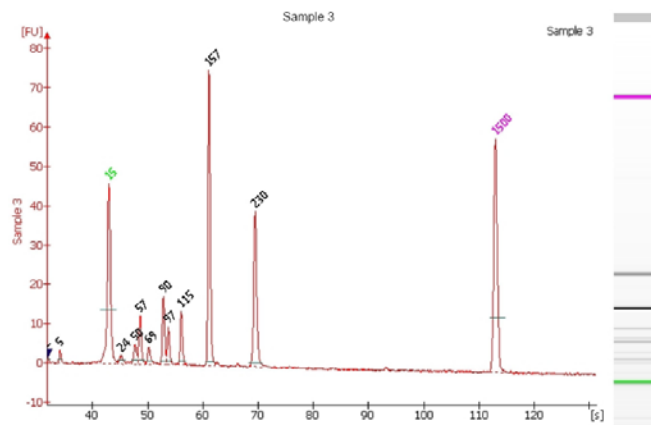
Number of peaks found: 9

Peak table for sample 12 : Sample 12

Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,11	7,0	
42	0,30	10,9	
54	0,16	4,4	
100	0,41	6,1	
104	0,57	8,3	
157	0,82	7,9	
180	2,05	17,3	
201	0,07	0,5	
480	3,94	12,4	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...26\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_12-39-10.xad
Read: 26.7.2006 12:39:10
Modified: 27.7.2006 9:04:37

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 3 : Sample 3

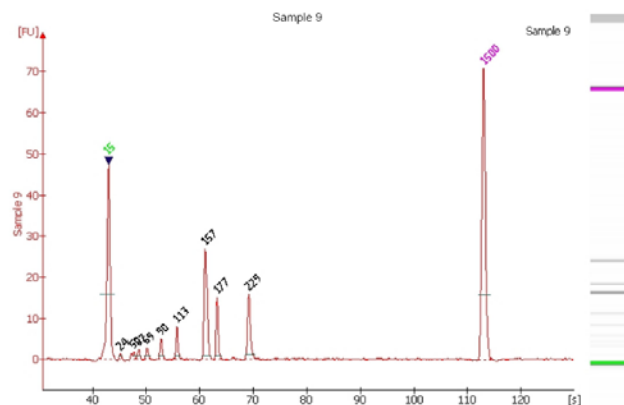
Number of peaks found: 9

Peak table for sample 3 : Sample 3

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
2	0,00	0,0	
5	0,00	0,0	
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,29	18,2	
50	0,43	13,1	
57	0,89	23,7	
69	0,35	7,6	
97	0,97	16,4	
115	0,52	8,2	
157	0,70	9,2	
230	3,51	34,0	
	2,07	13,7	

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...07\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-08-07_14-01-49.xad
Read: 7.8.2006 14:01:49
Modified: 7.8.2006 14:43:41

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 9 : Sample 9

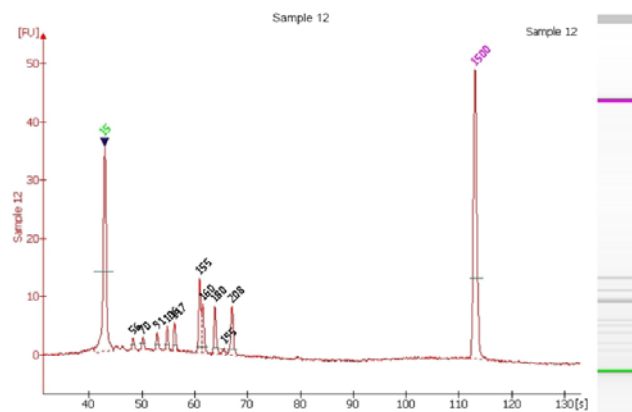
Number of peaks found: 9

Peak table for sample 9 : Sample 9

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,08	5,1	
50	0,08	2,6	
57	0,13	3,5	
69	0,15	3,2	
97	0,24	4,0	
113	0,32	4,2	
157	1,49	14,4	Possible Co-Migration of 4 Peaks
177	0,52	4,5	
229	0,69	4,5	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga B: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata OB1(22) LB (zgoraj) in BO2(22) M9+Glc (spodaj) iz skupine II.

Electropherogram Summary Cont ...



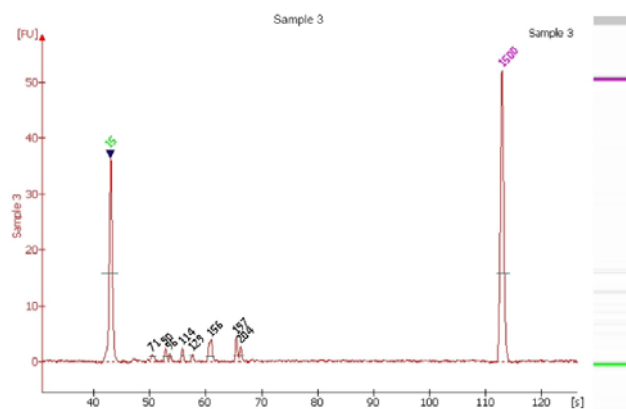
Overall Results for sample 12 : Sample 12

Number of peaks found: 10

Peak table for sample 12 : Sample 12

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
56	0,16	4,3	
70	0,14	3,1	
91	0,19	3,2	
106	0,23	3,3	
117	0,27	3,6	
155	0,84	8,2	Possible Co-Migration of 2 Peaks
160	0,45	4,2	
180	0,47	4,0	
195	0,07	0,5	Questionable Peak
208	0,51	3,7	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 3 : Sample 3

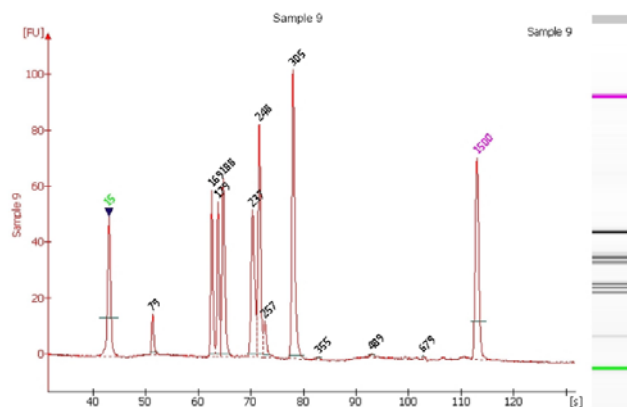
Number of peaks found: 8

Peak table for sample 3 : Sample 3

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
71	0,13	2,7	
90	0,16	2,7	
96	0,07	1,2	
114	0,12	1,6	
129	0,07	0,8	
156	0,37	3,6	
197	0,21	1,6	
204	0,12	0,9	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga C: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata ASWK14 (zgoraj) in VP1(22) LB (spodaj) iz skupine III.

Electropherogram Summary Cont ...

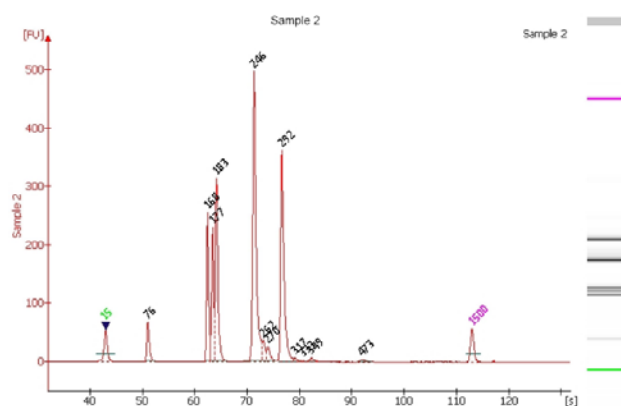


Overall Results for sample 9 : Sample 9
 Number of peaks found: 11

Peak table for sample 9 : Sample 9

Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
79	0,71	13,6	
169	2,20	19,8	
179	2,05	17,3	
188	2,89	23,3	
237	2,78	17,8	
248	3,21	19,6	
257	0,53	3,1	
305	3,91	19,4	
355	0,04	0,2	
489	0,04	0,1	
679	0,02	0,0	

Electropherogram Summary Cont ...



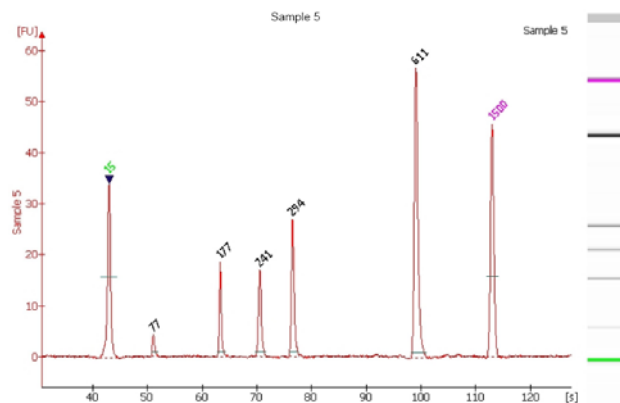
Overall Results for sample 2 : Sample 2
 Number of peaks found: 12

Peak table for sample 2 : Sample 2

Size [bp]	Conc. [ng/ul]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
76	4,85	97,2	
168	12,30	110,8	
177	11,24	96,3	
183	17,41	144,1	
246	31,24	192,2	
262	1,96	11,3	
270	1,62	9,1	
292	20,31	105,3	
317	0,39	1,9	
333	0,04	0,2	
349	0,45	2,0	

Priloga D: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata ASWK10 (zgoraj) in NS2(22) LB (spodaj) iz skupine IV.

Electropherogram Summary Cont ...



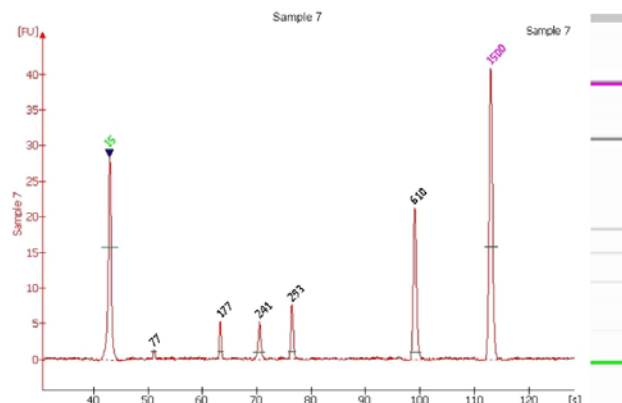
Overall Results for sample 5 : Sample 5

Number of peaks found: 5

Peak table for sample 5 : Sample 5

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
77	0,36	7,2	
177	1,05	8,9	
241	1,15	7,3	
294	1,58	8,2	
611	3,23	8,0	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 7 : Sample 7

Number of peaks found: 5

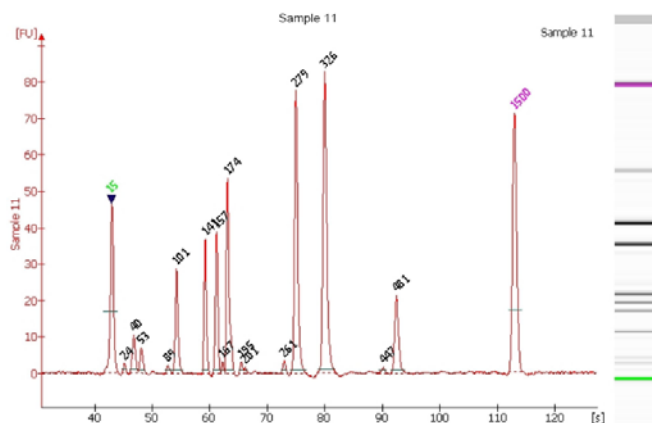
Peak table for sample 7 : Sample 7

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
77	0,09	1,8	
177	0,30	2,5	
241	0,38	2,4	
293	0,45	2,3	
610	1,17	2,9	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga E: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata VP3(22) LB (zgoraj) in VP4b(22) LB (spodaj) iz skupine V.

Assay Class: DNA 1000 Read: 1.8.2006 11:36:27
Data Path: C:\...01\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-08-01_11-36-27.xad Modified: 28.8.2006 15:19:31

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 11 : Sample 11

Number of peaks found: 16

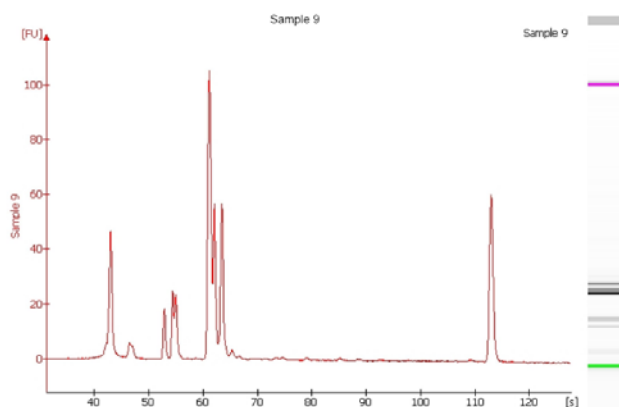
Peak table for sample 11 : Sample 11

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,18	11,0	
40	0,77	29,3	
53	0,44	12,5	
89	0,12	2,1	
101	1,35	20,2	
141	1,39	14,9	
157	1,55	14,9	
167	0,10	0,9	
174	2,23	19,4	
195	0,12	0,9	
251	0,12	0,7	
279	2,94	16,0	
226	3,30	15,3	
447	0,05	0,2	
481	0,73	2,3	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Upper Marker

Assay Class: DNA 1000 Read: 1.8.2006 12:33:09
Data Path: C:\...01\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-08-01_12-33-09.xad Modified: 1.8.2006 13:14:03

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 9 : Sample 9

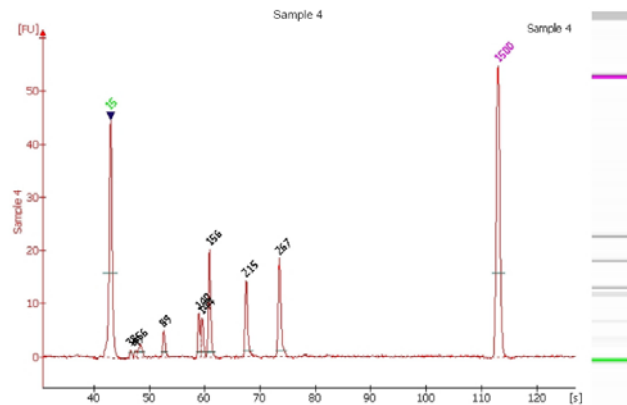
Number of peaks found: 9

Peak table for sample 9 : Sample 9

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
37	0,78	31,9	
91	0,99	16,5	
103	1,17	17,2	
107	1,31	18,5	
157	7,07	68,3	
165	2,64	24,2	
177	2,81	24,0	
193	0,22	1,7	
205	0,06	0,4	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga F: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata SWK13 (zgoraj) in ASWG3 (spodaj) iz skupine VI.

Electropherogram Summary Cont ...



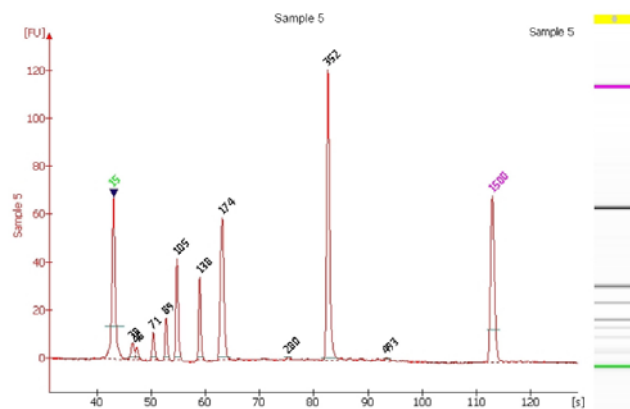
Overall Results for sample 4 : Sample 4

Number of peaks found: 9

Peak table for sample 4 : Sample 4

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
38	0,10	4,1	
49	0,09	2,8	
56	0,28	7,5	Possible Co-Migration of 2 Peaks
89	0,29	5,0	
140	0,43	4,7	
144	0,40	4,2	
156	1,06	10,4	Possible Co-Migration of 2 Peaks
215	0,68	6,8	
267	0,89	5,1	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 5 : Sample 5

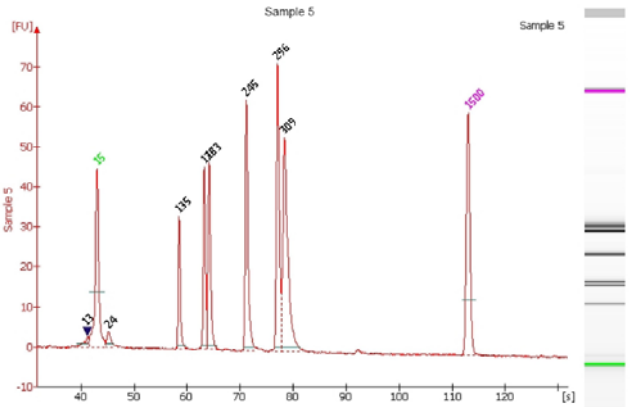
Number of peaks found: 10

Peak table for sample 5 : Sample 5

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
38	0,54	21,6	
46	0,28	9,3	
71	0,54	11,6	
89	0,74	12,6	
105	1,78	25,7	
138	1,25	13,7	
174	3,30	28,7	
280	0,04	0,2	
352	3,83	16,5	
493	0,05	0,1	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga G: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata VP2(22) LB (zgoraj) in ASWK6 (spodaj) iz skupine VII.

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 5 : Sample 5

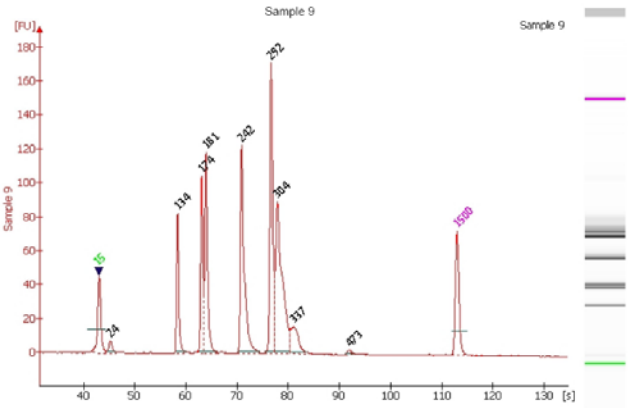
Number of peaks found: 7

Peak table for sample 5 : Sample 5

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
13	0,00	0,0	
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,54	34,0	Possible Co-Migration of 2 Peaks
135	1,55	17,4	
175	1,95	16,8	
183	2,34	19,4	
245	2,91	18,0	
296	3,02	15,4	
309	3,90	19,1	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga H: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata OB3(22) LB (zgoraj) in RT1(22) LB (spodaj) iz skupine VIII.

Electropherogram Summary Cont ...



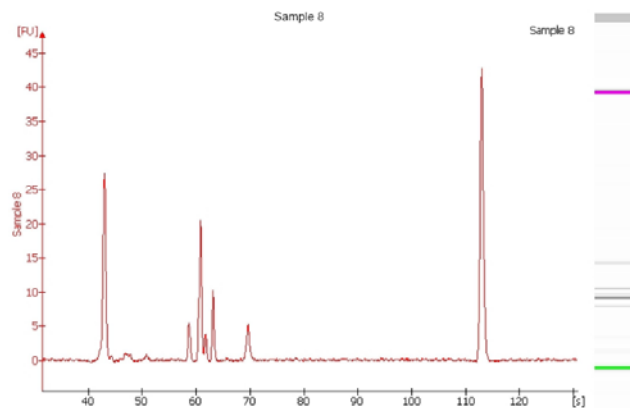
Overall Results for sample 9 : Sample 9

Number of peaks found: 9

Peak table for sample 9 : Sample 9

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
24	0,73	45,5	
134	3,30	37,3	
174	3,91	34,1	
181	5,38	45,0	
242	6,49	40,7	
292	6,35	32,9	
304	7,22	36,0	
337	4,49	6,7	
473	0,11	0,3	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Electropherogram Summary Cont ...



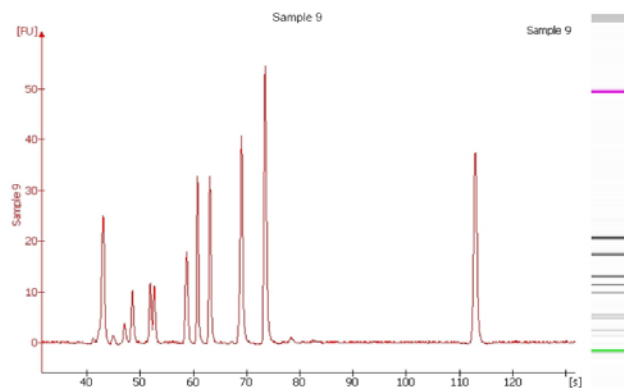
Overall Results for sample 8 : Sample 8

Number of peaks found: 6

Peak table for sample 8 : Sample 8

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
41	0,12	4,3	
136	0,42	4,7	
154	1,63	16,1	Possible Co-Migration of 3 Peaks
162	0,24	2,2	Questionable Peak
174	0,59	5,1	
231	0,42	2,7	Questionable Peak
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 9 : Sample 9

Number of peaks found: 11

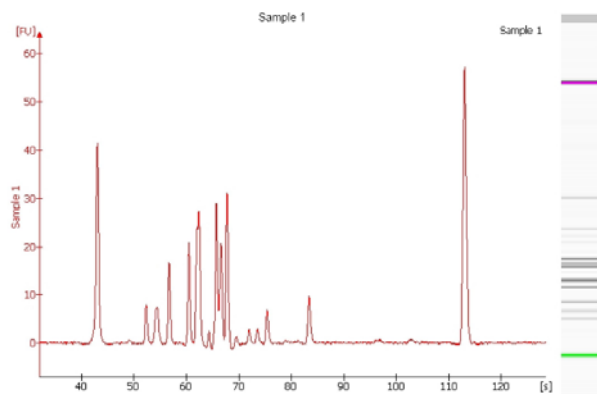
Peak table for sample 9 : Sample 9

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
23	0,24	15,7	
44	0,48	16,7	
57	1,20	31,8	
83	1,05	19,2	Possible Co-Migration of 2 Peaks
89	1,02	17,5	
137	1,76	19,6	
153	2,22	21,9	
174	2,42	21,2	
226	3,23	21,6	
265	3,90	22,3	
308	0,07	0,4	Questionable Peak
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga I: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata KJ4(22) LB (zgoraj) in MR1(22) LB (spodaj) iz skupine IX.

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...26\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_11-39-56.xad
Read: 26.7.2006 11:39:56
Modified: 28.8.2006 15:50:03

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 1 : Sample 1

Number of peaks found: 14

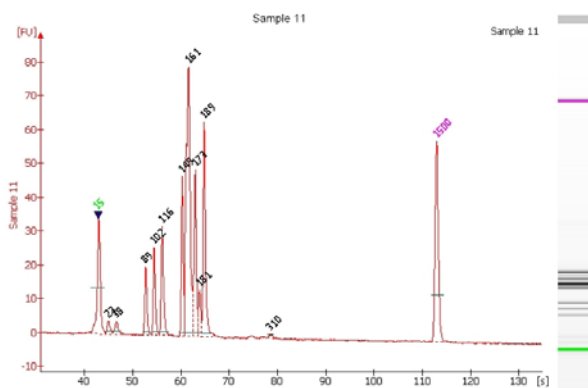
Peak table for sample 1 : Sample 1

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
86	0,51	8,9	
102	0,71	10,5	
121	0,92	11,5	
151	1,05	10,5	
167	2,33	21,1	
185	0,08	0,7	
197	1,34	10,3	
205	1,06	7,9	
214	1,42	10,0	
230	0,05	0,4	
251	0,13	0,8	
265	0,14	0,8	
281	0,30	1,6	
360	0,39	1,6	Upper Marker
1.500	2,10	2,1	

2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_12-39-10.xad

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...26\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_12-39-10.xad
Read: 26.7.2006 12:39:10
Modified: 27.7.2006 9:04:37

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 11 : Sample 11

Number of peaks found: 11

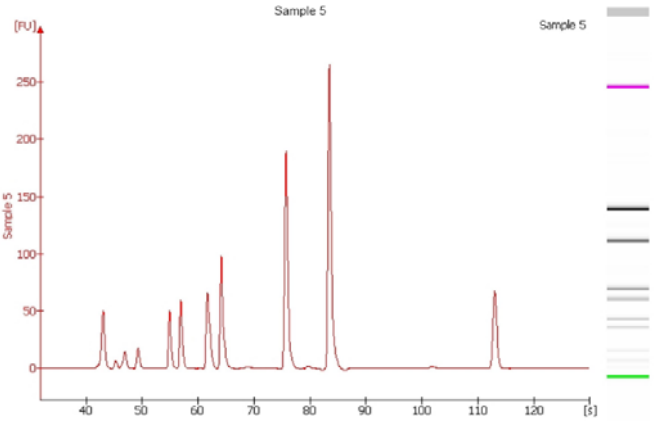
Peak table for sample 11 : Sample 11

Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
23	0,51	32,8	
38	0,46	18,3	
89	1,20	20,4	
102	1,41	20,9	
116	1,93	25,3	
149	2,27	23,0	
161	7,38	69,6	
173	2,73	23,9	
181	0,70	5,8	
189	3,16	25,3	
310	0,06	0,3	Upper Marker
1500	2,10	2,1	

Priloga J: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata BD1(22) LB (zgoraj) in RT4(22) LB (spodaj) iz skupine X.

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...26\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_11-39-56.xad
Read: 26.7.2006 11:39:56
Modified: 28.8.2006 15:50:03

Electropherogram Summary Cont ...

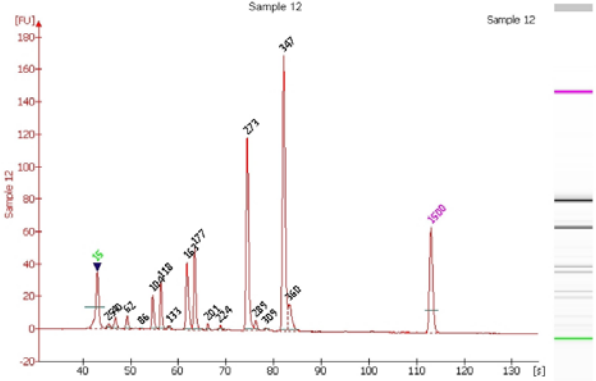


Overall Results for sample 5 : Sample 5
Number of peaks found: 11

Peak table for sample 5 : Sample 5			
Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
25	0,54	33,3	
42	1,19	42,8	
63	1,06	25,6	
106	2,44	34,8	
122	2,89	35,9	
161	4,22	39,7	
183	4,70	38,9	
284	7,72	41,2	
322	0,06	0,3	
361	9,80	41,2	
658	0,05	0,1	

Assay Class: DNA 1000
Data Path: C:\...26\2100 expert_DNA 1000_DE02000347_2006-07-26_12-39-10.xad
Read: 26.7.2006 12:39:10
Modified: 27.7.2006 9:04:37

Electropherogram Summary Cont ...



Overall Results for sample 12 : Sample 12
Number of peaks found: 16

Peak table for sample 12 : Sample 12			
Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
15	4,20	424,2	Lower Marker
25	0,39	23,9	
40	0,65	24,7	
62	0,53	13,0	
86	0,07	1,2	
104	1,14	16,6	
118	1,35	17,4	
133	0,19	2,1	
163	2,27	21,1	
177	2,19	18,7	
201	0,15	1,1	
224	0,14	1,0	
273	4,95	27,4	
289	0,24	1,2	
309	0,06	0,3	
347	6,74	29,4	
360	0,88	3,7	
1.500	2,10	2,1	Upper Marker

Priloga K: Elektroferogram, na spodnji in zgornji marker normiran gel (desno od elektroferograma) in preglednica dolžin restrikcijskih fragmentov za izolata BO3(22) LB (zgoraj) in SK2(22) LB (spodaj) iz skupine XI.