

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara KOVČE

**MIKROBNA RAZNOLIKOST PREVLEK, KI TVORIJO 'JAMSKO
SREBRO' V PAJSARJEVI JAMI**

DIPLOMSKO DELO
univerzitetni študij

**THE DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES THAT COLONIZE
CAVE WALLS AND FORM 'THE CAVE SILVER PHENOMENON' IN
THE CAVE PAJSARJEVA JAMA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medodelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za molekularno genetiko, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja, za somentorico dr. Lejlo Pašić in za recenzenta prof. dr. Davida Stopar.

Mentorica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Somentorica: dr. Lejla Pašić

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica : doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Lejla Pašić

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 8.10.2010

Naloga je rezultat lastnega raziskovalneega dela. Splodaj podpisana se strinjam z objavo diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da sta elektronska in tiskana oblika diplomske naloge enaki.

Barbara Kovč

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.26 + 579.8 : 551.435.84 (043)=163.6
KG jamsko okolje/Pajšarjeva jama/mikroorganizmi/mikrobne združbe/ biološka raznolikost/genske knjižnice/gen 16S rRNA
AV KOVČE, Barbara
SA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (mentorica)/PAŠIĆ, Lejla (somentorica) /STOPAR, David (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2010
IN MIKROBNA RAZNOLIKOST PREVLEK, KI TVORIJO 'JAMSKO SREBRO'
V PAJSARJEVI JAMI
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 57 str., 3 pregl., 17 sl., 99 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Iz skupne DNA vzorcev mikrobnih prevlek, ki smo jih aseptično odvzeli iz sten Pajšarjeve Jame (Vrhnika, Slovenija) smo pripravili šest klonskih knjižnic bakterijskega gena za 16S rRNA. Arhej v vzorcu nismo odkrili. Določili smo nukleotidno zaporedje vključkom skupno 280 za insert pozitivnih klonov. Analizirali smo 171 visokokvalitetnih nukleotidnih zaporedij. Pokazali smo, da je mikrobnna raznolikost v vzorcu Pajšarjeve Jame nepričakovano visoka. Rarefakcijska krivulja je potrdila, da bi dodatno vzorčenje pokazalo večjo mikrobnno raznolikost. Z izračunom cenilk raznolikosti smo ovrgli hipotezo, da je jamsko okolje za mikroorganizme skrajno okolje. V vzorcu mikrobnih prevlek Pajšarjeve Jame smo opisali predstavnike osmih debel *Bacteria*. V vzorcu mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve Jame so bili najbolj zastopani predstavniki debla *Proteobacteria* (predvsem razred *Gammaproteobacteria*), *Actinobacteria* in *Nitrospira*. Nukleotidna zaporedja smo na osnovi 3-odstotne razlike v evolucijskih razdaljah razdelili v 50 operativnih taksonomskih enot (OTU). S filogenetsko analizo smo ugotovili, da so predstavniki posameznih OTU le malo sorodni doslej opisanim bakterijskim vrstam. Predstavniki posameznih OTU so bili pogosto sorodni drugim okoljskim zaporedjem, ki so jih osamili v jamskem okolju. Sklepali smo, da stene Pajšarjeve Jame preraščajo mikrobnne prevleke, katerih sestava je edinstvena in ki jih v veliki meri sestavlja nove, doslej neopisane vrste.

KEY WORD DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 579.26 + 579.8 : 551.435.84 (043)=163.6
CX cave environment /cave Pajsarjeva jama/ microorganisms/microbial communities/biological diversity /gene library/gene 16S rRNA
AU KOVČE, Barbara
AA HERZOG VELIKONJA, Blagajana (supervisor)/PAŠIĆ, Lejla (co-advisor) / STOPAR, David (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2010
TI THE DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES THAT COLONIZE CAVE WALLS AND FORM 'THE CAVE SILVER PHENOMENON' IN THE CAVE PAJSARJEVA JAMA
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 57 p., 3 tab., 17 fig., 99 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB In this study, the diversity of prokaryotes constituting microbial communities colonizing the walls of the Pajsarjeva jama cave (Vrhnik, Slovenia) was examined. To this aim, six bacterial 16S rRNA gene libraries were constructed. We have sequenced a total of 280 clones and obtained 171 high-quality sequences. This analysis showed a high diversity within the *Bacteria*, while members of *Archaea* were not recovered. The application of various species richness estimators confirmed the diverse nature of the microbial community sample refuting the hypothesis that the cave environment is extreme for microorganisms. Furthermore, rarefaction curves indicated that the additional sampling would yield additional diversity. A total of eight bacterial phyla were detected in the analyzed samples. Members of *Proteobacteria* (class *Gammaproteobacteria*) were most abundant in the clone libraries and were followed in abundance by members of *Actinobacteria* and *Nitrospira*. Based on 3-percent differences in evolutionary distances, the sequences formed a total of 50 operational taxonomic units (OTU). The phylogenetic analysis showed that the vast majority of Pajsarjeva jama sequences were not related to any validly described species of *Bacteria*. Instead, the sequences were often related to environmental 16S rRNA gene sequences recovered in other hypogean environments. The unique structure and composition of studied microbial communities showed the broad spectrum of unknown and yet to be cultivated microorganisms inhabiting these cave systems.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KRATICE IN OKRAJŠAVE	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA SPELEOBIOLOGIJE	3
2.2 SPELEOGENEZA	5
2.3 EKOLOŠKA RAZVRSTITEV JAMSKIH ŽIVALI	6
2.4 MIKROBIOLOGIJA JAM.....	7
2.4.1 Mikrobiološke raziskave jam v Sloveniji	9
2.5 MOLEKULARNA FILOGENIJA	10
2.5.1 Ugotavljanje filogenetskih odnosov	11
2.6 NOVEJŠE TEHNIKE V MIKROBNI EKOLOGIJI	12
2.7 PAJSARJEVA JAMA	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	15
3.1.2 Raztopine.....	16
3.1.3 Gojišča	16
3.1.4 Bakterijski sevi	17
3.1.5 Plazmid pGEM®-T Easy	17
3.1.6 Začetni oligonukleotidi	18
3.1.6.1 Začetna oligonukleotida, uporabljena za pomnoževanje gena za 16S rRNA bakterij.....	18

3.1.6.2 Začetna oligonukleotida, uporabljena za pomnoževanje gena za 16S rRNA arhej	18
3.1.6.3 Začetna oligonukleotida, uporabljena za potrjevanje prisotnosti vključkov v klonskih knjižnicah	19
3.1.7 Laboratorijska oprema.....	19
3.2. METODE	19
3.2.1 Vzorčenje.....	19
3.2.2 Molekularno biološke metode	20
3.2.2.1 Osamitev celotne okoljske DNA	20
3.2.2.2 Ugotavljanje čistosti in koncentracije DNA.....	20
3.2.2.3 Osamitev gena za 16S rRNA	20
3.2.2.4 Izvedba agarozne gelske elektroforeze	20
3.2.2.5 Čiščenje DNA	21
3.2.2.6 Priprava in analiza klonskih knjižnic	21
3.2.2.8 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja	22
3.2.3 Analiza nukleotidnih zaporedij.....	22
3.2.3.1 Primerjava nukleotidnih zaporedij	22
3.2.3.2 Opredelitev operacijskih taksonomskih enot, izračun diverzitetnih cenilk in rarefakcijska analiza	23
3.2.3.3 Rekonstrukcija filogenetskih odnosov	23
4 REZULTATI	25
4.1 UGOTAVLJANJE FILOGNETSKEGA POLOŽAJA BAKTERIJ, KI TVORIJO 'JAMSKO SREBRO' V PAJSARJEVI JAMI.....	25
4.1.1 Vzorčenje in analiza vzorca.....	25
4.1.2 Priprava klonskih knjižnic	28
4.1.2.1 Osamitev skupne mikrobne DNA iz vzorca jamskega biofilma v Pajšarjevi jami	28
4.1.2.2 Specifično pomnoževanje genov za 16S rRNA	28
4.1.2.3 Priprava in analiza klonskih knjižnic	29
4.1.2.4 Splošna filogenetska raznolikost in vrstna bogatost v vzorcih jamskih prevlek Pajšarjeve jame	30
4.1.2.5 Analiza nukleotidnih zaporedij fragmentov gena za 16S rRNA	33
4.1.3 Filogenetska analiza genov za 16S rRNA skupne mikrobne DNA vzorcev mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame	36
4.1.3.1 <i>Actinobacteria</i> in <i>Acidobacteria</i>	36

4.1.3.2 <i>Proteobacteria</i>	37
4.1.3.3 <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Planctomycetales</i> , <i>Gemmatimonodales</i> , <i>Nitrospirales</i> in <i>Chloroflexi</i>	40
5 RAZPRAVA	42
5.1 VZORČENJE IN LASTNOSTI VZORCA.....	42
5.2 UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE NA PODLAGI PRIMERJAVE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IZ KLONSKIH KNJIŽNIC	43
5.2.1 Splošna raznolikost zaporedij v klonskih knjižnicah.....	43
5.2.2 Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA kot filogenetski označevalec	44
5.2.3 Filogenetska analiza zaporedij gena za 16S rRNA, osamljenih iz okoljske DNA mikrobnih prevlek Pajsarjeve Jame	44
5.2.4 Primerjava raznolikosti bakterij v mikrobnih prevlekah sten Pajsarjeve Jame in drugih raziskanih jamah	45
6 SKLEPI	48
7 VIRI	49
ZAHVALA	59

KAZALO SLIK

Slika 1. Zemljevid kraških področij na ozemlju Republike Slovenije (LTER-Slovenija, 2004)	3
Slika 2. Podobe o strašljivem življenju v jamah, pred vhodom v turistično jamo v jugozahodni Avstraliji. (Zagmeister, 2009: 4)	4
Slika 3. Drobnovratnik na litografiji iz leta 1871 (Hartwig, 1871: 163).	1
Slika 4. Lokacija Pajšarjeve Jame na zemljevidu, označena z rdečim krogom. (Ekataster jam, 2005)	14
Slika 5. Zgodnji obisk Pajšarjeve Jame, posneto okoli leta 1930 (Arhivirane vsebine, 2009). 14	
Slika 6. Shema plazmida pGEM®-T Easy (Promega Corporation, 2009).	18
Slika 7. (a) □Jamsko srebro□ v Pajšarjevi jami; (b) Mikrobnna združba od blizu, kjer se vidi sama tekstura biofilma na kamnitri osnovi.....	1
Slika 8. Skupna okoljska DNA iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, ločena v 0,8-odstotnem agaroznem gelu.	28
Slika 9. Z reakcijo s polimerazo pomnoženi deli genov za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, po elektroforetski ločitvi v 0,8 odstotnem agaroznem gel.	29
Slika 10. Preverjanje prisotnosti pomnoženih delov gena za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, v DNA pGEM® T-Easy z verižno reakcijo s polimerazo.....	1
Slika 11. Preverjanje prisotnosti pomnoženih delov gena za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, z rezanjem plazmidne DNA z encimom EcoRI	1
Slika 12. Razširjenost posameznih bakterijskih debel v knjižnicah gena za 16S rRNA iz okoljske DNA, osamljene iz vzorcev mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve Jame (Slovenija)... 31	
Slika 13. Rarefakcijska krivulja (A) in zbiralčeva krivulja cenilke Chao 1 (B) zaporedij gena za 16S rRNA mikrobnih prevlek v Pajšarjevi jami.....	32
Slika 14. Drevo največjega verjetja za predstavnike <i>Acidobacteria</i> in <i>Actinobacteria</i> v prevlekah Pajšarjeve Jame.....	37
Slika 15. Drevo največjega verjetja za predstavnike <i>Alphaproteobacteria</i> , <i>Gammaproteobacteria</i> in <i>Deltaproteobacteri</i> v prevlekah Pajšarjeve Jame.....	39
Slika 16. Drevo največjega verjetja za predstavnike <i>Betaproteobacteria</i> v prevlekah Pajšarjeve Jame.....	40
Slika 17. Drevo največjega verjetja za predstavnike <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Planctomycetales</i> , <i>Gemmatumonadales</i> , <i>Nitrospirales</i> , <i>Chloroflexales</i> in <i>Caldilineales</i> v prevlekah Pajšarjeve Jame.	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Genotip seva JM109 bakterije <i>E. coli</i>	17
Preglednica 2. Ocene raznolikosti mikrobov jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, ugotovljene pri 3-, 5- in 20-odstotni razlikih v evolucijskih razdaljah.	32
Preglednica 3. Seznam nukleotidnih zaporedij gena za 16SrRNA v podatkovnih zbirkah, ki so najbolj podobna nukleotidnim predstavnikom OTU iz Pajšarjeve jame.	33

KRATICE IN OKRAJŠAVE

A ₂₈₀	absorptivnost (negativni logaritem prepustnosti) pri svetlobi valovne dolžine 280nm
bp	bazni par
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
DNAza	deoksiribonukleaza
nt	nukleotid
OTU	operacijska taksonomska enota (operational taxonomic unit)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
SDS	natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SOB	izjemno ugodno gojišče (Super Optimal Broth)
SOC	izjemno ugodno gojišče s katabolno represijo (Super Optimal broth with Catabolite repression)
TE	pufer Tris-EDTA
TSE	pufer Tris-NaCl-EDTA
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid

1 UVOD

Podzemeljska okolja so naravne pa tudi umetne podzemeljske votline različnih velikosti (od kraških jam do sistema špranj v skali in prostorčkov med prodniki), katerim je skupna popolna odsotnost svetlobe in s tem tudi odsotnost primarne produkcije (Zagmajster, 2009). Tovrstna okolja so večinoma revna s hranili in zelo stabilna, saj se okoljske razmere v času le malo spreminja. Nestalna skromna preskrba s hrnilnimi snovmi je eden izmed kritičnih pogojev, ki vplivajo na oblikovanje podzemeljske favne, ki je največkrat odvisna od toka hrnil in energije iz površja, še posebej od fotosintetsko proizvedene organske snovi. Večina organskega materiala prispe v jamo preko pronica, razapljanja ali razpršitve vodnih kapljic skozi strop in z naplavinami po tleh in stenah s podzemnimi vodotoki. Organski material lahko v jame vstopi tudi z vetrom, kot dendrit (npr., trdni delci, kot so listje in leseni ostanki ali kot raztopljen organski ogljik) ali iztrebki netopirjev in pticev (Hüpop, 2000). Vnešena hranila zadoščajo za razvoj raznolikih mikrobnih združb, ki so posebej v skrajno oligotrofnih jamah, pogosto kemolitotrofne. Jamski mikrobi lahko kot vir hrnil uporabljajo tudi amonij, nitrat, žveplo, mangan ali spet oksidirajo železo (Northup in Lavoie, 2001).

Slovenija je kraška dežela, saj je več kot 40-odstotkov njenega površja iz karbonatnih kamnin od devonske do miocenske starosti (Gams, 2004). V številnih jamah Slovenije, pa tudi drugod po dinarskem krasu opazimo mikrobne prevleke, pokrite z drobnimi kapljami vode, ki ob osvetlitvi odsevajo srebrno ali zlato svetobo. Prav zaradi tega so si med lokalnimi speleologji tovrstne prevleke prislužile ime 'jamsko srebro'. Zgodnje raziskave 'jamskega srebra' segajo še v sedemdeseta leta prejšnjega stoletja, ko sta Megušar in Sket (1973) pokazala organsko naravo teh prevlek in pozneje tudi v čisti kulturi osamila nekaj jamskih bakterij. Pokazali so, da gre za pripadnike *Actinobacteria*, ki niso bili sorodni nobeni, do tedaj opisani vrsti (Kovač, 1971; Merlak, 1975). Toda, ti dragoceni izolati so se s časom izgubili, raziskave pa so opustili.

Pajšarjeva jama, ki se nahaja 20 km jugovzhodno od Ljubljane, je še posebej bogata z 'jamskim srebrom'. Ta horizontalna, lahko dostopna jama, je dolga 555 m. Skoznjo teče majhen potok, ki ob vhodu v jamo ustvari strugo in teče po Podlipski dolini naprej. Jamo le občasno obiščejo jamarji in speleologi, drugače pa je v potoku v jami napeljana cev, ki jo uporablja bližnji kmet za oskrbo valilnice rib. V notranjosti jame lahko zasledimo prepletanje

makroskopskih kolonij bele, rumene, sive in roza barve, ki so od blizu vidne kot grudaste prevleke, debeline do 1 mm na karbonski ali glineni podlagi. Na njih se nabirajo kapljice vode, ki jim ob osvetlitvi dajejo srebrn videz. O kopenski favni jame imamo le malo podatkov, saj so poročali le o skromnih kolonijah troglobilnih netopirjev *Rhinolophus hipposideros* in *Rhinolophus ferrumequinum*. Poleg nekaterih troglobiontov, favna potoka vključuje plazečo postranico *fossarum* *Gammarus*, številne ličinke *Chironomidae*, manj številne ličinke *Plecoptera* (rod *Nemoura* sp.), *Rotatoria* in *Acarina* in le en osebek *Elmintidae* (*Coleoptera*) *Trichoptera* in *Hydra* sp (Fišar, 2009). Sladkovodni postranici *Ingolfiella beatrice* (Ruffo in Vonk, 2001) in *Hadzia fragilis stochi* (Karaman, 1972) sta v Sloveniji edini predstavnici svojega rodu in edino znano nahajališče je v Pajsarjevi jami (Fišar, 2009).

1.1 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge smo si prizadevali ugotoviti, kakšna je vrstna sestava mikrobov, ki v Pajsarjevi jami tvorijo prevleke jamskega srebra. Zanimalo nas je, katere vrste bakterij in arhej sestavljajo te prevleke, katere med njimi so najbolj pogoste in ali gre za vrste, ki so prisotne tudi v drugih okoljih ali za jamske specialiste. Pričakujemo, da je vpliv človeka s postavitvijo odvodne cevi v vodotoku in življenjem v neposredni bližini jame doprinesel k temu, da v mikrobnih združbah Pajsarjeve jame lahko najdemo predstavnike, ki so drugače tipični za predele obdelovalnih zemeljskih površin ali so drugače povezani s človekom. Želeli smo, da bi rezultati diplomske naloge prispevali k poznovanju jamskih mikrobov dinarskega krasa.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da je raznolikost mikrobov v oligotrofnem jamskem okolju nizka, v primerjavi s hranili bogatimi sistemi.

Predvidevali smo, da je sestava mikrobne združbe, ki naseljuje stene Pajsarjeve jame edinstvena in nesorodna mikrobnim združbam v drugih, doslej študiranih, jamah.

Predvidevali smo, da jame naseljujejo ozko specializirani mikroorganizmi, najverjetneje nove, doslej neopisane vrste.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA SPELEOBIOLOGIJE

Speleobiologija je veda, ki se ukvarja z raziskovanjem podzemeljskih okolij in organizmov, ki jih naseljujejo. Podzemeljska okolja so naravne pa tudi umetne podzemeljske votline različnih velikosti (od kraških jam do sistema špranj v skali in prostorčkov med prodniki), katerim je skupna popolna odsotnost svetlobe, s tem pa tudi odsotnost primarne produkcije (Zagmajster, 2009). Tovrstna okolja so večinoma revna s hranili in zelo stabilna, saj se okoljske razmere v času le malo spreminjajo. Slovenija je kraška dežela, saj je več kot 40-odstotkov njenega površja iz karbonatnih kamnin od devonske do miocenske starosti (Gams, 2004).



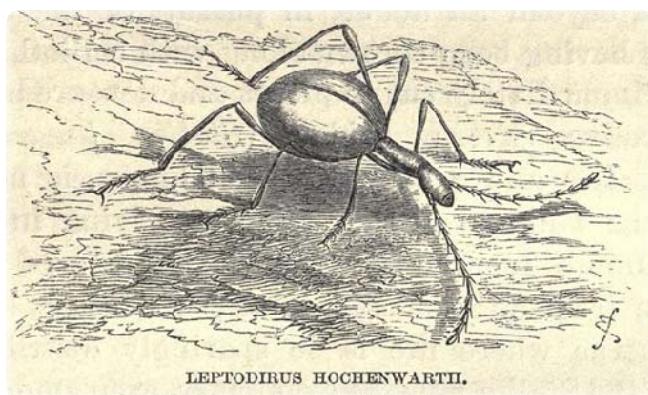
Slika 1. Zemljevid kraških področij na ozemlju Republike Slovenije (LTER-Slovenija, 2004)

V Sloveniji je znanih že več kot 8200 kraških jam (Ekataster jam, 2005), zato ne preseneča, da opisi prvih jamskih živali izvirajo prav iz slovenskega ozemlja. Že v 17. stoletju je Janez Vajkard Valvasor v svojem znamenitem delu Slava Vojvodine Kranjske omenjal človeško ribico, sicer le kot □navadno golazen□, medtem ko so domačini v njej videli zmajevega mladiča (Slika 2). Šele stoletje kasneje je bila znanstveno opisana z latinskim imenom *Proteus anguinus* in pravilno prepoznana za dvoživko. V naslednjem stoletju, 1831, je Luka Čeč, svetilničar v Postojnski jami, iz jame prinesel hrošča nenavadne oblike. Preko grofa

Hochenwarta je žival prišla v roke naravoslovcu Ferdinandu Schmidtu, ki je v njej prepoznal ne le za znanost novo živalsko vrsto, temveč tudi vrsto, specializirano na življenje izključno v jamah. Leta 1832 je v ljubljanskem časopisu Illyrisches Blatt izšel znanstveni opis te živali, ki ji je Schmidt poleg znanstvenega imena *Leptodirus hochenwartii*, dal tudi lepo slovensko ime – drobnovratnik (Slika 3). Šele to odkritje je pozornost naravoslovcev usmerilo na dotlej povsem prezrto živiljenjsko okolje. Začeli so z iskanjem živali v jamah, sledila so nova odkritja, sprva na slovenskem krasu, kmalu pa tudi po kraških območjih drugod po svetu (Zagmajster, 2009).



Slika 2. Podobe o strašljivem življenju v jamah, pred vhodom v turistično jamo v jugozahodni Avstraliji. (Zagmeister, 2009: 4).



Slika 3. Drobnovratnik na litografiji iz leta 1871 (Hartwig, 1871: 163).

2.2 SPELEOGENEZA

Speleogeneza je veda, ki opisuje proces nastanka kraške Jame. V nastanek Jame je vpleteneih več geoloških in kemijskih procesov kot so vodna erozija, delovanje tektonskih sil, delovanje mikroorganizmov, prisotnost atmosferskih vplivov ali delovanje človeka. Najbolj pogosto nastanejo Jame z raztplavljanjem topnih kamnin kot so apnenec, kreda, dolomit, marmor, sol in sadra. Raztplavljanje je posledica pronicanja podtalnice skozi prelome, plasti in razpoke v kamninah, povzroča pa ga ogljikova in druge organske kisline. Raztplavljanje apnenca ustvarja apnenčaste Jame, pa tudi kraško pokrajino z značilnimi površinskimi pojavi kot so požiralniki, vrtače, uvale ali presihajoča jezera. Znotraj apnenčastih jam pogosto najdemo tvorbe, ki nastanejo zaradi dolgotrajnega nalaganja kalcijevega karbonata. Zelo značilni so sekundarni mineralni sedimenti, ki se imenujejo kapniki. Med te spadajo stalaktiti, stalagmiti, stebri, cevčice, zavesne in ponvice. Jame lahko nastajajo tudi z drugimi procesi. Tako primarne Jame nastajajo istočasno kot kamnine iz katerih so zgrajene. Najbolj pogost primer takšnih jam so kanali lave, ki se oblikujejo zaradi delovanja vulkanov. Jame se lahko v celoti oblikujejo zaradi erozije tekoče vode, ki s seboj prenaša kamenje in druge usedline. Delovanje morja povzroča erozijo, ki rezultira v nastanku morskih jam. Jame lahko nastanejo tudi z delovanjem vetra ali s topnjanjem ledu pod ledeniki (Culver in Pipan, 2009).

Geološko gledano je kras del zemeljske skorje, katerega značilnosti pogojuje kemično delovanje vode na relativno dobro topne karbonatne kamnine. Zakrasevanje karbonatnih kamnin se začne takoj, ko kamnina preide iz okolja nastanka v neko drugačno okolje, ki je večinoma pod vplivom meteorne vode. Ko apnenec in dolomit zakrasujeta, se pri tem načeloma raztplljata minerala kalcit in dolomit. Za razvoj krasa na karbonatnih kamninah je najpomembnejša kemijska reakcija raztplavljanje z ogljikovo kislino. Deževnica se v atmosferi in pri ponikanju skozi tla obogati s CO_2 , in z njim tvori šibko ogljikovo kislino (enačba 1):



ki pri ponikanju skozi karbonatne kamnine le-te topi, pri čemer nastajajo kalcijevi in hidrogenkarbonatni ioni (enačba 2):



Intenzivnost raztplavljanja je odvisna od zunanjih dejavnikov, med katerimi sta posebej pomembna klima in relief, ter od lastnosti karbonatne kamnine. Podnebje, ki ga v veliki meri določata geografska širina in relief vpliva posredno tudi na pokritost določenega območja s

tlemi in rastlinjem ter količino CO₂ v vodi. Z raztapljanjem nastajajo za kras značilne podzemeljske in površinske oblike ter podzemeljski vodni odtok.

Beseda kras ima v slovenskem jeziku tri pomene. Kras prvotno pomeni golo, kamnito pokrajino, ki se kot ime v Sloveniji pogosto pojavlja s krajevnimi toponimi ali pa označuje celo pokrajino. Kras z veliko začetnico pomeni karbonatno planoto med Tržaškim zalivom, Vipavsko dolino in Divačo. Na tem območju se je začelo preučevanje apnenčaste pokrajine in njenih pojavov in zato danes predstavlja zibelko speleologije pri nas in po svetu. Beseda kras pa lahko nastopa tudi kot ime za naselbine in ledine in je najpogosteje na obrobju Dinarskega, osamelega krasu oziroma kjer se pogosteje izmenjavata goli in pokriti kras. V Sloveniji kras prekriva 43-odstotkov površja in sicer 35-odstotkov površja na apnencu in 8-odstotkov na dolomit. Kras je pri nas razvit na različnih karbonatnih kamninah, ki po starosti segajo od devonija do miocena ter tudi mlajših karbonatnih brečah in konglomeratih. Glede na geološke, hidrološke, morfološke in pokrajinske pogoje, kras v Sloveniji po Habiču delimo na tri večje enote: Alpski kras, Dinarski kras ter Predalpski vmesni in osamljeni kras.

Dinarski kras, kamor spada obravnavano ozemlje, se nahaja v južni Sloveniji. Na njem ločimo dva tipa reliefa: Visoki dinarski kras (kras visokih planot: Javorniki, Hrušica, Nanos, Trnovski gozd, Banjšice in Snežnik) in Nizki dinarski kras (kras v nižjih predelih; svet podolij in dolin: Notranjsko podolje, Pivška kotlina, Kras). Za Dinarski kras so značilni apnenci in dolomiti permske, triasne, jurske, kredne in paleogenske starosti, ki jih sekajo prelomne strukture v prevladujoči dinarski smeri, to je SZ-JV. To je kras z velikim številom vrtač, kraških polj, uravnanim površjem in visokimi kraškimi platoji. Na Dinarskem krasu je najbolj izrazit erozijski proces raztapljanje, drugi procesi, kot so to npr. fluvialna erozija ali pobočni procesi, pa imajo podrejeno vlogo. Za Dinarski kras so značilna tudi velika kraška polja, kot sta Cerkniško in Planinsko polje, ki si sledijo v nizih v območju močnejših prelomnih con (na primer Idrijski prelom). V tem krasu je veliko število jam, med drugimi tudi naš najdaljši jamski sistem, to je sistem Postojnskih jam, z okrog 20 km znanih rogov (Zupan, 2010).

2.3 EKOLOŠKA RAZVRSTITEV JAMSKIH ŽIVALI

Glede na prilagojenost jamskem okolju lahko organizme, ki naseljujejo jame, razdelimo v štiri skupine (Sket, 2008).

Troglokseni ali slučajneži, so tiste vrste, ki se v podzemnih habitatih pojavljajo le občasno in se tam ne morejo obdržati. Troglokseni so naključni obiskovalci jam, ki se v njih zadržujejo zaradi vlage, hrane ali zaščite in jih najdemo predvsem ob vhodnih delih Jame. Sem prištevamo npr. populacije komarjev, ki jih najdemo v večini jam.

Subtroglofili so vrste, ki se dokaj redno zadržujejo v podzemljtu, vendar pa za eno od življenskih funkcij nujno potrebujejo površje, na primer na površju opravljajo nekatere biološke funkcije kot sta hranjenje ali razmnoževanje. Subtroglofili so netopirji (*Chiroptera*), jamski ptiči (hudourniki *Aerodramus spp.*) in nekatere jamske ribe.

Evtroglofili so sicer površinske vrste, ki pa lahko podobno dobro uspevajo v podzemljtu; to so vrste, ki lahko oblikujejo jamske populacije, te pa se na podzemlje tudi povsem navežejo. Med evtroglofile prištevamo npr. izpodnega raka *Asellus aquaticus*.

Troglobionti pa so vrste, ali pa le (zgoraj omenjene) populacije vrst, ki praviloma preživijo le v podzemljtu. Med troglobionte prištevamo npr. močerila (*Proteus anguinus*). Troglobionti so praviloma tudi troglomorfni, vendar ne vsi. Med oblikovne spremembe, ki so posledica jamskega življenja prištevamo zakrnevanja (najpogosteje kožnih barvil in oči) in izrazitejšo razvitost nekaterih telesnih delov (največkrat daljšanje trupa).

2.4 MIKROBIOLOGIJA JAM

Jame gostijo zelo različne mikroorganizme, od katerih so nekateri zelo ozko specializirani. Bakterije, arheje, glice in protozoji so splošno razširjeni v podzemnih habitatih in naseljujejo večino raziskanih jam. Četudi lep delež mikroorganizmov v jame zaide s površja, gostijo jame tudi veliko še neopisanih vrst, katerih metabolite bi lahko uporabili tako v medicini kot tudi v biotehnologiji. Za jame se zanimajo tudi astrobiologi, saj je jamsko okolje dober modelni sistem za preučevanje možnosti razvoja življenja na drugih planetih (Culver in Pipan., 2009).

V odsotnosti primarne produkcije je življenje v jami največkrat odvisno od vnosa organskih snovi iz površja. Hranila v jamo lahko vstopijo neposredno – preko rastlinskih korenin ali iztrebkov netopirjev. Posredno vstopajo hranila v jamo z vodnimi kapljami, ki prehajajo skozi strop jame ali kot delci, ki jih prenaša zrak. Dodatni vir hranil je tudi ilovica, ki jo delovanje podzemnih vodnih tokov nalaga na tla in stene jame. V doslej raziskanih jamah so bile koncentracije hranil nizke in so le redko presegale 0,5 mg celokupnega organskega ogljika na

liter (ang. TOC- total organic carbon; Barton in Jurado, 2007), kar nakazuje, da v splošnem lahko imeli jamsko okolje za oligotrofno. Toda, v jamskih kamninah zasledimo tudi do 10^6 celic različnih bakterijskih vrst na gram kamnine (Barton in Jurado, 2007). Eden izmed razlogov za tako pogostost jamskih mikrobov je možnost kemolitotrofije – pridelave organske snovi iz anorganske. Kemolitotrofija, kot način prehranjevanja mikroorganizmov, so prvič opisali leta 1970 v globokomorskih hidrotermalnih vrelcih in je strmoglavila ekološko dogmo, da je življenje na Zemlji odvisno le od sončne svetlobe (Deming in Barros, 1993). Jamski kemolitotrofi so bili prvič opisani v jami Movile v Romuniji (Dickson in Kirk, 1969) in so vpleteni v oksidacijo železa, oksidacijo žvepla, redukcijo sulfata, redukcijo železa, oksidacijo amonija, metanogenezo in metanotrofijo (Culver in Pipan., 2009). Nekateri celo predvidevajo, da podzemeljska primarna produkcija kemolitoavtotrofov presega dejavnost fotosintetskih organizmov na površini zemlje (Stevens, 1997).

Mikroorganizmi lahko tudi aktivno sodelujejo v nastanku jam. Tako nitaste bakterije iz razredov *Epsilonproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*, kolonizirajo karbonatno površino jam in kot stranski produkt metabolizma proizvajajo žveplovo kislino, ki razaplja kamnino. Nitaste bakterije se v jamskem okolju močno razraščajo in tvorijo prostim očesom vidne puhaste strukture bele barve pritrjene na podlago ali prosto plavajoče v vodi sulfidnih jam (Engel in sod., 2001). Drug primer so glice rodu *Streptomyces* spp., ki lahko s svojo metabolno aktivnostjo poškodujejo stalaktite (Groth in sod., 1999).

Človek s svojo prisotnostjo močno vpliva na združbo jamskih mikroorganizmov, kar ima lahko resne posledice za celoten jamski ekosistem. Še posebej je vpliv človeka izražen v takoimenovanih 'turističnih' jamah, ki jih zaradi lepote okrasov ali prisotnosti paleolitskih poslikav letno obišče veliko število ljudi. že 50.000 obiskovalcev na leto je v jami Tito Bustillo v Španiji povzročilo povišanje koncentracij CO₂, H₂O in temperature (Schabereiter-Gurtner in sod., 2002b) in razraščanje makroskopskih kolonij bakterij vrst *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* ter predstavnikov *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (Schabereiter-Gurtner in sod., 2002b). Razraščanje kolonij škoduje paleolitskim poslikavam, saj metaboliti kolonij povzročijo razgradnjo in razbarvanje barvnih pigmentov, ki poslikave sestavljajo. Tako *Bacillus* spp. in *Arthrobacter viscosus*, osamljena iz kamnine s poslikavo, reducirata hematit - osnovno sestavino starodavnega barvila rdeča kreda (Gonzalez in sod., 1999). Dodatno lahko razraščanje kolonij povzroči biomineralizacijo in s tem odstopanje preperelih kamnin s poslikavami iz sten jam (Ciferri, 1999). Poslikave lahko poškodujejo tudi

alge, kot je to *Bracteacoccus minor*, ki je povzročil pojave zelenkaste prevleke na površini poslikav v jami Altamira v Španiji (Ciferri, 1999; Schabereiter-Gurtner in sod., 2002a).

Prisotnost človeka vpliva tudi na prisotnost sporulirajočih gliv, katerih število lahko močno naraste ob slučajnem vnosu hrani v slabo prezračenih špiljah (Jurado in sod., 2010). Kot zadnjo bi omenili najbolj ogroženo turistično jamo Lascaux v Franciji, ki so je že 20 let po odkritju zaprli zaradi močnega razraščanja alg po stenah jame. V letih, ki so sledila, so jamo klimatizirali in zaradi razraščanja gliv *Fusarium solani*, večkrat tretirali z biocidi. Posledično se je združba jamskih mikroorganizmov povsem spremenila in jo danes sestavljajo človeku patogene bakterije in entomopatogene glice (Bastian in sod., 2010).

2.4.1 Mikrobiološke raziskave jam v Sloveniji

V jamaх na slovenskem so doslej opisali bakterije, glice alge in protozoje in sicer v vodnih telesih, kamnitih površinah, na/v sedimentih in v gvanu. Ob vhodih v jamo, kjer je še prisotna sončna svetloba, pa tudi globlje v jamaх ob umetni razsvetljavi, so opisali aerobne cianobakterije in alge. Med jamskimi fototrofi na slovenskem so še posebej pogosti *Aphanocapsa muscicola*, *Chlorella* sp., *Lyngbya* sp., *Synechocystis* sp in *Trentepohlia aurea* (Mulec, 2005). Nekaj teh vrst je tipično jamskih, kot je to cianobakterija *Geitleria calcarea*, ki so jo opisali na slabo osvetljenih stenah Škocjanske jame (Mulec, 2005).

Prisotnost ameb in drugih protozojev v jamskih sistemih Slovenije je slabo raziskana. Mulec in Walochnik (2007) sta izolirala iz jamskih ponvic v jami Pečina v Borštu potencialno patogeno amebo *Acanthamoeba castellanii* genotype T4 in amebo *Hartmannella vermiformis*. Obe amebi lahko služita kot vektorja za znotrajcelične patogene bakterije. (Mulec in Kosi., 2008).

Med jamskimi mikroorganizmi pogosto zasledimo glice. Že Megušar in Sket (1973) sta v bakterijskih prevlekah na kamnitih površinah jam odkrila *Penicillium* sp in *Aspergillus* sp. Mulec in sodelavci (2002) pa so na preporelem apnencu izolirali glico *Cladosporium herbarum*. Glice v jamaх najdemo tudi na živih in mrtvih odrasli živalih in na ličinkah metuljev. Tako je Tkavc (2007) iz živih in mrtvih troglofilnih metuljev *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata* izoliral glico vrst *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* in *Lecanicilium fusicolor*.

S klasičnimi tehnikami osamitve mikroorganizmov v čisti kulturi so doslej preučevali prisotnost mikroorganizmov v jami Pečina v Borštu v jamskih ponvicah, mikrobnih prevlekah

na stenah jam in v preperelem apnencu; v Marinski jami v preperelem apnencu in v Snežni jami na Raduhi v kalcitnem jamskem mleku (Mulec s sod., 2002, Mulec in Kosi, 2008). V vseh preučenih mikrookoljih so prevladovale fluorescentne psevdomonade, kar so pripisali metabolični raznolikosti skupine (Mulec, 2008). Največ mikroorganizmov v čisti kulturi so pridobili iz preperelega apnenca v jami Pečina, kjer je število mikroorganizmov doseglo 1.1×10^6 CFU/ml (Mulec in sod., 2002).

V jama na slovenskem ozemlju pogosto zasledimo večbarvne (rumene, sive, bele ali roza) mikrobne prevleke, debeline 1 mm, ki preraščajo karbonatne ali ilovnate stene in strope jam. Prevleke so pogosto prekrite s vodnimi kapljicami, ki ob osvetlitvi na karakterističen način odbijajo svetlobo. Le-ta je videti zlata ali srebrna, v odvisnosti od barve spodaj ležečih kolonij. Zato lokalni jamarji opisujejo te pojave kot 'jamsko srebro' ali 'jamsko zlato' (Mulec in sod., 2002). Bakterijske prevleke so pričeli preučevati že v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja v Planinski jami. Ugotovili so, da značilna obarvanost ni posledica magnezijevih ali soli železa. Nekaj mikroorganizmov, ki sestavlajo prevleke so tudi osamili v čisti kulturi. Uvrstili so jih v red *Actinomycetales*, niso pa bili sorodni nobeni do tedaj opisani vrsti (Kovač, 1971; Merlak, 1975).

2.5 MOLEKULARNA FILOGENIJA

Molekularna filogenija je veda o evolucijskih odnosih med organizmi, ki jih preučujemo s primerjavo primarne strukture makromolekul (Wen-Hsiung in Graur, 1991). Veda se je razvijala vzporedno z razvojem molekularno-bioloških tehnik. Filogenetske odnose so sprva preučevali na podlagi primerjave primarnih struktur proteinov (Zuckerkandl in Pauling, 1965). Kot prvo so primerjali primarno strukturo citokromov in feredoksinov (Fitch in Margoliash, 1967). Ugotavljanje filogenetskih odnosov na podlagi zaporedja nukleotidov v nukleinskih kislinah se je začelo uvajati v 70-ih letih, z razvojem metode za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja z dideoksinukleotidi (Sanger in sod., 1997), ki je omogočila ugotavljanje zaporedja daljših fragmentov nukleinskih kislin. Istočasno z razvojem molekularno-bioloških tehnik so Woese in sodelavci pokazali, da so genski zapisi za malo ribosomsko podenoto uporabni kot splošni filogenetski označevalci (Fox in sod., 1977).

Običajno primerjamo nukleotidna zaporedja, ki so prisotna v vseh preučevanih organizmih, katerih struktura se med evolucijo ne spreminja, ki vsebujejo evolucijsko ohranjene dele, se

ne prenašajo horizontalno in so dobro poznana ter zbrana v podatkovni bazi zaporedja za filogenetsko analizo so prosto dostopna v spletnih podatkovnih bazah kot so GenBank, EBI ('European Bioinformatics Institute') ali 'Ribosomal Data Base Project II'. Za primerjavo in iskanje zaporedij so na voljo različni algoritmi: FASTA3 ali BLAST (Pearson, 1990; Altschul in sod., 1990).

2.5.1 Ugotavljanje filogenetskih odnosov

Ugotavljanje filogenetskih odnosov iz primarne strukture bioloških makromolekul temelji na konceptu pozicijske kovariance. Filogenetske odnose predstavimo s filogenetskim ali genealoškim drevesom. To drevo je dendrogram, sestavljen iz razcepišč in vej. Slednje pomenijo določeno taksononsko enoto, ki se razvija (anageneza), razcepišča pa pomenijo razcep enega taksona v dva (kladogeneza). Vzorec ceplitve taksona imenujemo topologija drevesa. Filogenetske odnose manjšega števila sorodnih taksonov pregledno prikažemo z radialnimi drevesi, medtem ko se za dendrograme odločimo takrat, ko ugotavljamo filogenetske odnose večjega števila taksonov. Prvi korak filogenetske analize je poravnava zaporedij (ang. 'multiple sequence alignment'), ki poravna najbolj homologne odseke zaporedij.

Metode izdelave filogenetskih dreves temeljijo na evolucijskih modelih. Evolucijski modeli so matematični približki poteka evolucije, ki pri modeliranju upoštevajo parametre, kot so opažene frekvence nuklotidnih baz ali število in teža opaženih substitucij. Od obstoječih metod najpogosteje uporablajo distančne metode, metodo kriterija varčnosti (ang. 'maximum parsimony'), metodo največjega verjetja (ang. 'maximum likelihood') in metodo Bayesian.

Med distančne metode prištevamo metodo povezovanja sosedov (ang. 'neighbor joining'; Saitou in Nei, 1987) in metodo Fitcha in Margoliasha (Fitch in Margoliash, 1967). Obe metodi slonita na matrikah razdalj, ki jih pridobimo z binarno primerjavo poravnanih zaporedij in ocenjevanjem deleža razlik med zaporedji. Opažene razlike na osnovi primerjnega evolucijskega modela prevedemo v evolucijske razdalje. Filogenetsko drevo izračunamo s programskega orodja, ki izračuna evolucijske razdalje med vsemi posameznimi pari nukleotidnih zaporedij. Par, ki ima najmanjšo evolucijsko razdaljo združimo in ga v nadaljevanju obravnavamo kot eno zaporedje. Izračun nadaljujemo toliko časa, da so v drevesu le dvovejnata vozlišča.

V nasprotju z distančnimi metodami, kriterij varčnosti predvideva, da je ohranjanje znaka evolucijsko bolj verjetno kot sprememba le-tega. Najbolj verjetno drevo po kriteriju varčnosti je tisto, pri katerem je število sprememb znaka najmanjše. Metoda kriterija varčnosti se bolj kot distančne metode izogne problemu plezimorfij (povratnih mutacij, ki prikrijejo evolucijske spremembe). Vendar pesti kriterij varčnosti problem privleka dolgih vej (ang. 'long branch attraction'), ki ne glede na evolucijske odnose prikaže kot sorodne hitro razvijajoče se linije (Edgell in sod., 1996; Bergsten, 2005).

Metoda največjega verjetja predvideva, da je najbolj verjetno tisto drevo, ki glede na izbrani model evolucije oriše evolucijske spremembe, ki so z največjo verjetnostjo pripeljale do današnjih zaporedij (Aldrich, 1997). Metoda pri izračunu upošteva številne parametre, kot so razmerje med tranzicijami in transverzijami, variabilnost pozicij, verjetnost stanja znaka na določeni poziciji in številne druge.

Bayesova analiza oceni verjetnost, da je izbrani evolucijski model pravilen, glede na dostopne podatke. Analiza obsega naključno vzorčenje možnih filogenetskih dreves. Pravilnost evolucijskega modela in zanesljivost vozlišča oceni s posteriorno verjetnostjo. Le-to je nemogoče analitično izračunati, zato je simulirano z algoritmom 'Markov Chain Monte Carlo'. V grobem je analiza podobna metodi največjega verjetja s samovzorčenjem, le da je dosti hitrejša (Huelsenbeck in Ronquist, 2001).

Zanesljivost posameznih vozlišč najpogosteje ocenimo z metodo samovzorčenja (ang. 'bootstrapping'). Metoda samovzorčenja naključno vzorči poravnana zaporedja ter za vsako naključno vzorčeno podskupino mest naredi filogenetsko drevo. Le-to potem primerja z osnovnim drevesom in pripiše vrednost ponovljivosti vozlišča.

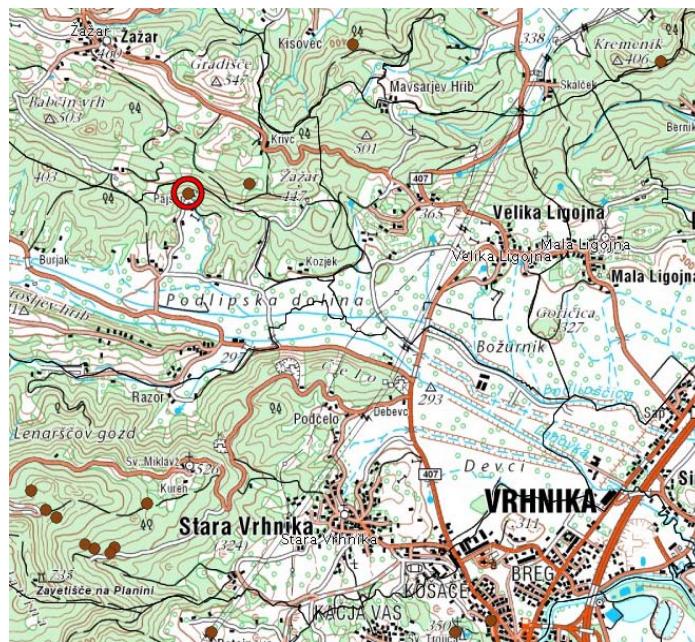
2.6 NOVEJŠE TEHNIKE V MIKROBNI EKOLOGIJI

Sodobne tehnike mikrobne ekologije, ki jih uporabljam za zajemanje in opis mikroorganizmov lahko razdelimo v dve veliki skupini. V prvo uvrščamo tehnike osamitve mikroorganizmov v čisti kulturi. Prednost teh metod je možnost opredelitve metabolnega potenciala mikroorganizma in študije fiziologije, ki lahko pripeljejo do opisa novih vrst. Tehnike osamitve v čisti kulturi pa nam omogočajo le osamitev tistih mikroorganizmov, ki pri danih laboratorijskih pogojih rastejo. Pravzaprav ocenjujejo, da več kot 90-odstotkov mikroorganizmov ni mogoče osamiti v čisti kulturi (Staley in Konopka, 1985).

Mikroorganizme lahko spoznavamo tudi brez klasične tehnike čiste kulture in sicer tako, da uporabimo tehnike molekularne biologije, ki nam omogočajo neposredno osamitev DNA iz okolja in opredelitev filogenetskih odnosov na osnovi primerjave zaporedij nukleotidov v DNA. Najbolj pogosto v ta namen uporabljam gen za 16S rRNA, ki je del zapisa za malo podenoto ribosoma. Nukleotidno zaporedje tega gena se v času le malo spreminja (Woese in sod., 1990).

2.7 PAJSARJEVA JAMA

Pajšarjeva jama leži 20 km jugozahodno od Ljubljane, pri mestu Vrhnika ($45^{\circ}59'51.57''$ $14^{\circ}15'56.7''$) (Slika 4). Je horizontalna jama, dolga 555 m in globoka 20 m. Skozi jamo teče manjši vodotok, ki podzemlje zpušča na vhodu jame. Jama je bila opisana 22.08.1928 in jo od tedaj speleologi občasno obiskujejo (Slika 5). V jami najdemo skromno število netopirjev *Rhinolophus hipposideros* (Bechstein) in *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber), opisali so tudi postranice *Gammarus cf. fossarum*, številne ličinke *Chironomidae*, manj številne ličinke *Plecoptera* (cf. *Neumoiura* sp.), *Rotatoria* in *Acarina* in samo en primerek *Elmintidae* (Coleoptera), *Trichoptera* in *Hydra* sp. Zadnja leta so v jami prisotne cevi, ki vodijo v manjšo ribogojnico. Jama je izjemno bogata z bakterijskimi prevlekami. Le-te smo vzorčili v vhodni galeriji pred sifonom, ki preprečuje dostop v druge dele jame. Za vzorčeni del jame je sicer značilna popolna odsotnost svetlobe.



Slika 4. Lokacija Pajšarjeve jame na zemljevidu, označena z rdečim krogom. (Ekatsterjam, 2005).



Slika 5. Zgodnji obisk Pajšarjeve jame, posneto okoli leta 1930 (Arhivirane vsebine, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

agarosa Seakem LE	Biozym, Nemčija
akridin oranž	Sigma, ZDA
amonijev acetat	Merck, Nemčija
ampicilin	Sigma, ZDA
Bacto agar	Difco, ZDA
EDTA	Kemika, Hrvaska
Etanol	Merck, Nemčija
etidijev bromid	Sigma, ZDA
Glicerol	Kemika, Hrvaska
IPTG	Sigma, ZDA
NaCl	Merck, Nemčija
kompleta za izolacijo skupne okolske DNA: ‘Power Soil DNA kit’	MoBio, ZDA
‘Ultra Clean Soil DNA kit’	
komplet za kloniranje produktov PCR: ‘pGEM® T Vector System II’	Promega, ZDA
komplet za čiščenje produktov PCR: ‘QIAquick PCR purification kit’	Qiagen, ZDA
Taq DNA-polimeraza	Biotoools, Španija
komplet za izolacijo plazmidne DNA:	

'Wizzard Plus SV minipreps'

Promega, ZDA

X-gal

MBI Fermentas, Litva

4.1.2 Raztopine

nanašalni pufer za agarozno elektroforezo

0,25-odstoten bromfenol modro

0,25-odstoten ksilen cianol

40-odstotna (w/v) saharoza

založna raztopina pufra TBE za agarozno elektroforezo (5×)

0,45 M Tris-borat (pH 8,0)

10 mM EDTA

pufer TSE

300 mM NaCl

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA (pH 8,0)

3.1.3 Gojišča

Vsa gojišča smo pred uporabo avtoklavirali. Pred avtoklaviranjem smo po 10 ml tekočega gojišča razlili v primerno označene epruvete. Pri pripravi trdnih gojišč smo dodali 13 g agarja (Seakem) na liter gojišča, avtoklavirali in vlili v sterilne petrijevke. Gojiščem smo po potrebi dodali antibiotik ampicilin (Sigma) v končni koncentraciji 100 µg/ml, ter X-gal (MBI Fermentas) v končni koncentraciji 40 µg/ml in IPTG (Sigma) v končni koncentraciji 0,1 mM.

Gojišča za rast sevov *Escherichia coli*

Gojišče Luria Bertani (LB)

10 g kazeinski hidrolizat

5 g kvasni ekstrakt

10 g NaCl

Gojišče SOB

20 g Bacto tripton

5 g Bacto kvasni ekstrakt

0,5 g NaCl

10 ml 250 mM KCl

5 ml 2 M MgCl₂

Gojišče SOC

gojišču SOB smo dodali 20 ml 1 M glukoze

3.1.4 Bakterijski sevi

Uporabili smo komercialno pripravljene celice seva JM109 bakterije *Escherichia coli* (v nadaljevanju *E.coli*), ki omogočajo učinkovitejšo transformacijo in večji donos plazmidov ob osamitvi, kot drugi sevi *E. coli*. Zato so primerne za pomnoževanje plazmidov, za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja in za nadaljnjo transformacijo v ekspresijske seve.

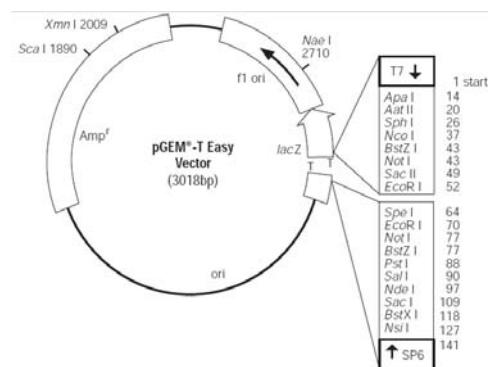
Preglednica 1. Genotip seva JM109 bakterije *E. coli*

Sev <i>E.coli</i>	Genotip
JM109	E14-(McrA)- <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rk-mk+) <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB)</i> [F- <i>traD36 proAB lacI^q ZΔM 15</i>]

3.1.5 Plazmid pGEM®-T Easy

Plazmidi serije pGEM® se uporabljam za kloniranj produktov verižne reakcije s polimerazo. Osnovni vektor pGEM®-5Zf(+) (Slika 6) je razrezan z restrikcijskim encimom *EcoRV*. Na

nastala 3' konca proizvajalec veže terminalni timidin, kar močno ojača učinkovitost kloniranja produktov verižne reakcije s polimerazo. Vektor je v celici prisoten v velikem številu kopij. Kot pri plazmidu pUC19 je poliklonsko mesto znotraj zaporedja za α -peptidno regijo encima β -galaktozidaze, kar omogoča α -komplementacijo. Poliklonsko mesto je obdano s promotorjem T7 in SP6 RNA-polimeraze, kar omogoča ugotavljanje nukleotidnega zaporedja vključka z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma T7 in SP6. Vključek iz plazmida sprostimo z restrikcijo z enim od treh encimov: EcoRI, NotI ali BstZ. Mesto ori nitastega faga f1 omogoča nastanek enoverižne DNA.



Slika 6. Shema plazmida pGEM®-T Easy (Promega Corporation, 2009).

3.1.6 Začetni oligonukleotidi

3.1.6.1 Začetna oligonukleotida, uporabljena za pomnoževanje gena za 16S rRNA bakterij

Za specifično pomnoževanje gena za 16S rRNA bakterij smo uporabili splošna, za bakterije specifična začetna oligonukleotida, 27F ($5'$ -AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG- $3'$) in 1492R ($5'$ -GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T- $3'$), ki se prilegata mestoma 7-27 in 1492-1511 gena za 16S rRNA (oštrevilčeno kot pri *E. coli*, Brosius in sod., 1981) v orientaciji proti 3' in 5' (Macalady in sod., 2006).

3.1.6.2 Začetna oligonukleotida, uporabljena za pomnoževanje gena za 16S rRNA arhej

Začetna oligonukleotida, uporabljena za pomnoževanje gena za 16S rRNA arhej, Arch21F ($5'$ -TTC-CGG-TTG-ATC-CYG-CCG-GA- $3'$) in Arch958R ($5'$ -YCC-GGC-CTT-GAM-TCC-AAT-T- $3'$) se prilegata mestoma 2-21 in 958-976 gena za 16S rRNA (oštrevilčeno kot pri *E. coli*, Brosius in sod., 1981), v orientaciji proti 3' in 5' (DeLong, 1992).

3.1.6.3 Začetna oligonukleotida, uporabljeni za potrjevanje prisotnosti vključkov v klonskih knjižnicah

Za potrjevanje prisotnosti vključka v klonskih knjižnicah smo uporabili začetna oligonukleotida T7 (5'-TAA-TAC-GAC-TCA-TAG-GG-3') in SP6 (5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-AA-3'). Prilegata se promotorjema T7 in SP6 RNA-polimeraze, ki obdajata poliklonsko mesto plazmida pGEM® -T Easy.

3.1.7 Laboratorijska oprema

aparatura za elektroforezo	HE33 Mini Horizontal Submarine Unit, Hoffer, ZDA
	napajalnik E835, Consort, Belgija
aparat za PCR	GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, ZDA
centrifuge	5417 C, Eppendorf
	Rotanta 460R, Hettich, Nemčija
magnetno mešalo	Tehnica MM540, Slovenija
mikroskop	Opton, Zeiss, Nemčija
spektrofotometer	UV-2101 PC Szimadzu, Japonska
vibracijski stresalnik	RC-TK, Infors HT, Švica
vodne kopeli	Multitemp II 2219, LKB Pharmacia Biotech, ZDA

3.2. METODE

3.2.1 Vzorčenje

Vzorce mikrobnih prevlek smo aseptično odvzeli 27.3.2008 v Pajšarjevi jami. Vzorčili smo stene prerasle z združbo bakterij in nabrani biološki material do uporabe shranili v sterilnih plastičnih petrijevkah.

Ugotovili smo naslednje fizikalno-kemijske parametre: pH vode (ISO 10523) ter temperaturo.

3.2.2 Molekularno biološke metode

3.2.2.1 Osamitev celotne okoljske DNA

Celotno okoljsko DNA smo osamili z uporabo komercialnih kompletov 'Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit' (MoBio) in 'Power Soil DNA Isolation Kit' (MoBio) v skladu s navodili proizvajalca. Osamljeno DNA smo do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.2.2 Ugotavljanje čistosti in koncentracije DNA

Koncentracijo DNA smo ugotovili spektrofotometrično z merjenjem A_{260} in A_{280} , ob upoštevanju, da absorbtivnost $A_{260} = 1$ ustreza koncentraciji 50 µg/ml za dvoverižne molekule DNA (New England Biolabs Inc., Catalog & Technical Referenc. ZDA; 2000). Čistost vzorca smo preverili z ugotavljanjem razmerja A_{260}/A_{280} , ki mora biti za čiste vzorce DNA med 1,8 in 2,0.

3.2.2.3 Osamitev gena za 16S rRNA

Gene za 16S rRNA smo iz okoljske DNA pomnožili s *Taq* DNA-polimerazo ter začetnima oligonukleotidoma 27F in 1492R (poglavlje 4.1.6.1). Razmere verižne reakcije s polimerazo so bile: začetna denaturacija DNA pri 94 °C (5 min), ki je sledilo 25 ciklov 94 °C (1 min), 45 (45 s), 72 °C (1 min) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (20 min). Pomnoževali smo tudi po spremenjenem protokolu: začetna denaturacija DNA pri 94°C (5 min), ki ji sledi 25 ciklov 94 °C (1 min), 50 °C (25 s), 72 °C (2 min) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (20 min).

Prisotnost DNA arhej smo preverjali z začetnima oligonukleotidoma Arch21F in Arch 958R. Razmere verižne reakcije s polimerazo so bile: začetna denaturacija DNA pri 94 °C (10 min), ki ji sledi 25 ciklov 95 °C (1 min), 58 °C (1 min), 72 °C (2 min) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (7 min).

3.2.2.4 Izvedba agarozne gelske elektroforeze

Velikost in čistost pridobljenih vzorcev DNA smo preverili v 0,8-odstotnem agaroznem gelu, ki smo mu dodali etidijev bromid v končni koncentraciji 0,5 µg/ml. Elektroforeza je tekla v $0,5 \times$ pufru TBE (0,45 M Tris-borat (54 g Tris, 27,5 g borov kislina), 10 mM EDTA (pH 8,0)). V jamice gela smo nanesli 8 delov vzorca DNA in 2 dela nanašalnega pufra (0,25-odstotno bromfenolmodro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna (w/v) saharoza). Elektroforeza je tekla pri napetosti 100 V/cm.

3.2.2.5 Čiščenje DNA

Čiščenje produktov verižne reakcije s polimerazo

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo pred ligacijo očistili s komercialnim kompletom 'QIAquick PCR Purification Kit' v skladu s navodili proizvajalca (QIAquick Spin Handbook, QIAGEN, ZDA, 2001).

Čiščenje DNA z etanolnim obarjanjem

Vodni raztopini DNA smo dodali 0,3 volumna 10 M amonacetata in 3 volumne ledenomrzlega absolutnega etanola. DNA smo obarjali 20 minut pri -80 °C in centrifugirali 20 minut pri 14000 obr./min (20800×g). Usedlino smo dvakrat sprali s hladnim, 80-odstotnim etanolom. Oborino smo posušili na zraku, DNA resuspendirali v sterilni vodi in do uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.2.6 Priprava in analiza klonskih knjižnic

Raznolikost mikrobov v biofilmih sten Pajšarjeve jame smo ugotavljali tako, da smo gene za 16S rRNA, namnožene iz vzorca skupne mikrobne DNA, naključno klonirali v vektor pGEM® T-Easy (Promega, ZDA). Tako pripravljene rekombinantne plazmide smo vnesli v kompetentne celice seva *E. coli* JM101, ki omogočajo zaznavo klonov z α-komplementacijo. Skupaj smo iz vzorcev biofilma jamskih bakterij Pajšarjeve jame pripravili šest genskih knjižnic.

Preverjanje prisotnosti vključkov v plazmidih genskih knjižnic z verižno reakcijo s polimerazo

Prisotnost vključkov ustrezne velikosti smo preverili z verižno reakcijo s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma SP6 in T7, ki se prilegata na konca poliklonskega mesta plazmida pGEM®-T Easy. Razmere verižne reakcije s polimerazo so bile: začetna denaturacija DNA pri 94 (5 min), ki ji sledi 25 ciklov 94 °C (60 s), 53 °C (60 s), 72 °C (90 s) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (10 min).

Preverjanje prisotnosti vključkov v plazmidih genskih knjižnic z rezanjem rekombinantnega plazmida

Prisotnost ustreznih insertov v plazmidu smo preverili z rezanjem rekombinantnega plazmida z restriktično endonukleazo *EcoRI* (MBI Fermentas) v skladu z navodili proizvajalca.

3.2.2.8 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja

Pri ugotavljanju nukleotidnega zaporedja smo kot matrično DNA uporabili plazmidno DNA, ki smo jo s komercialnim kompletom 'Wizzard Plus SV minipreps' (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca v koncentraciji 100 µg/ml osamili iz prekonočne kulture. Ugotavliali smo nukleotidna zaporedja vključkov 280 klonov šestih klonskih knjižnic, ki smo jih izbrali naključno. Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA so v podjetju Macrogen Inc (Seoul, Korea) ugotavliali z avtomatskim sekvenatorjem ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, ZDA). Za ugotavljanje nukleotidnega zaporedja smo uporabili začetna oligonukleotida 27F in 1492R.

3.2.3 Analiza nukleotidnih zaporedij

3.2.3.1 Primerjava nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja smo uredili v programske orodju Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, ZDA). Himerna zaporedja smo prepoznali in iz nadaljnjih obravnav izključili z uporabo programov CHECK-CHIMERA, dostopnim na spletni strani Ribosomal Database Project II (Cole in sod., 2003) ter Bellerophon (Huber in sod., 2004).

V analizo smo vključili tudi nukleotidna zaporedja, podobna zaporedjem pridobljenim v tej študiji. Le-ta smo poiskali v podatkovnih zbirkah GenBank z iskalcem BLASTN, Greengenes z iskalcem Classify in 'Ribosomal Database Project II' z iskalcem Seqmatch.

Zaporedja smo poravnali s programske orodjem MUSCLE (Edgar, 2004). Nestabilna območja smo v poravnavi prepoznali s programske orodjem CORE spletnega strežnika Tcoffee (Notredame in sod., 2000). Na osnovi tako dobljenih rezultatov smo zaporedja razdelili v štiri skupine, ki smo jih obravnavali ločeno. Skupine so bile: po Gramu pozitivne bakterije in *Acidobacteria* (40 zaporedij, 1188 mest), *Betaproteobacteria* (32 zaporedij, 1220 mest), *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* in *Deltaproteobacteria* (46 zaporedij, 1232 mest) ter *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadaceae* in *Nitrospiraceae* (31 zaporedij, 1154 mest).

3.2.3.2 Opredelitev operacijskih taksonomskeih enot, izračun diverzitetnih cenilk in rarefakcijska analiza

Nukleotidna zaporedja smo razdelili v operacijske taksonomske enote (OTU). Matriko evolucijskih razdalj po Kimurinem dvoparametričnem modelu smo izračunali z uporabo programskega orodja DNADIST, ki je del programskega paketa PHYLIP (Felsenstein, 2001). Za opredelitev operacijskih taksonomskeih enot smo uporabili algoritmom najbolj oddaljenega soseda, ki je vgrajen v programskem orodju DOTUR (Schloss in Handelsman, 2005). Algoritmom najbolj oddaljenega soseda je omejen ('constrained') kriteriji, ki zaporedje posamezni skupini pridruži le, če je le-to podobno vsem zaporedjem, ki so že v skupini. Pri zaporedjih gena 16S rRNA smo operacijske taksonomske enote definirali pri 3 odstotni razlike v evolucijskih razdaljah.

Programsko orodje DOTUR smo nadalje uporabili za izračun cenilk, ki nakazujejo raznolikost (cenilka Shannon-Weaver, H'), dominanco (Simpsonova cenilka, SI') in vrstno raznolikost (cenilki Chao 1 in ACE), ter za izdelavo rarefakcijske krivulj.

3.2.3.3 Rekonstrukcija filogenetskih odnosov

Rekonstrukcijo filogenetskih odnosov smo izpeljali na osnovi splošnega časovnega reverzibilnega modela evolucije zaporedij (angl. ' general time reversible model of sequence evolution (GTR)') s porazdelitvijo gama, stopnjo heterogenosti in deležem invariabilnih mest. Iskanja po metodi največjega verjetja (maximum likelihood) in kriteriju varčnosti (parsimony), smo izpeljali z uporabo programskih orodij PAUP* in PHYML (Guindon in Gascuel, 2003). Ponovljivost vozlišč v drevesu smo ocenili z neparametričnim testom samovzorčenja in z izračunom Bayesovih posteriornih verjetnosti (Rannala in Young, 1996). Slednje smo pri enakih pogojih, kot pri metodi največjega verjetja, ugotovili s programskim orodjem MrBayes 3.0b4 (Huelsenbeck in Ronquist, 2001). Za izračun smo uporabili algoritmom 'Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo' (Larget in Simon, 1999) s prednastavljenim parametrom segrevanja. Istočasno smo vodili tri tople in eno mrzlo verigo Markov, za 10^6 generacij, iz katere smo drevesa vzorčili na vsakih 100 generacij. Da bi zagotovili stacionarnost verig, smo začetnih 6-odstotkov dreves zavrgli kot 'burn-in'. Iz preostalih 9400 dreves smo na osnovi pogostosti posameznih kladov izračunali posteriore verjetnosti.

Podporo topologijam največjega verjetja in kriterija varčnosti smo ocenili s tisoč ponovitvami neparametričnega testa samovzorčenja. Ob tem smo uporabili hevristični 'branch-swapping' algoritmom TBR z $10 \times$ naključnim dodajanjem zaporedij.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE FILOGNETSKEGA POLOŽAJA BAKTERIJ, KI TVORIJO 'JAMSKO SREBRO' V PAJSARJEVI JAMI

Filogenetski položaj in vrstno pestrost mikrobnih prevlek, ki tvorijo 'jamsko srebro' v Pajšarjevi jami, smo ugotavljali na podlagi primerjave zaporedij za 16S rRNA. Skupaj smo iz vzorcev biofilma jamskih bakterij Pajšarjeve jame pripravili šest genskih knjižnic in na podlagi rekonstrukcije filogenetskih odnosov izrisali drevo največjega verjetja (maximum likelihood). Dobljene rezultate smo primerjali s podatki, ki so jih na podoben način pridobili v mikrobioloških raziskavah jam po svetu.

4.1.1 Vzorčenje in analiza vzorca

Vzorce jamskih mikrobnih prevlek smo aseptično odvzeli dne 27.3.2008 dopoldan, v Pajšarjevi jami v bližini Vrhnik. Na stenah jame smo opazili raznobarvne kolonije, ki tvorijo mikrobne prevleke debeline do 1 mm. Prevleke so bile različno velike. Ponekod so prekrivale več deset centimetrov velike površine, spet drugod so bile vidne kot majhne posamezne kolonije premora 1 mm. Kamnina na kateri so nastale mikrobne prevleke ni bila povsod enaka, saj je ponekod bila preperela in mehka, drugod pa še vedno trda. Če smo v prevleke usmerili tok svetlobe, so le-te odsevale različne barve, največkrat bisernato srebrne in zlate (Slika 7a). S prostim očesom smo lahko na stenah jame ločili posamezne kolonije roza, bele, rumene in sive barve, ki so zaradi podlage bile nekoliko grudastega videza (Slika 7b).

Vzorce mikrobnih prevlek smo odvzeli v popolnoma temnem delu vhodne galerije, nekaj deset metrov od vhoda v jamo in pred sifonom, ki preprečuje enostaven dostop v daljne dele jame. Da bi zajeli čim večjo vrstno pestrost prokariontov, smo s skalpelom aseptično odstranili mikrobne prevleke na površinah velikosti približno 2 m^2 , na obeh bregovih struge. Odvzeli smo šest vzorcev, vsakega iz površine približne velikosti $0,1\text{ m}^2$. Biološki material smo do uporabe shranili v sterilnih plastičnih petrijevkah in na ledu. Vzorce smo obdelali takoj po vrnitvi v laboratorij ozioroma jih shranili pri $-80\text{ }^\circ\text{C}$. V času vzorčenja je bila temperatura v jami $12\text{ }^\circ\text{C}$, relativna vlažnost zraka je bila 100-odstotkov, vrednost pH vodnih kapljic, ki so bile na prevlekah, je bila 7.0.

Pod optičnim mikroskopom smo opazili razvezjane filamente, ki jih pogosto opazimo pri pripadnikih *Actinobacteria*, pa tudi palčke in kokoidne oblike.

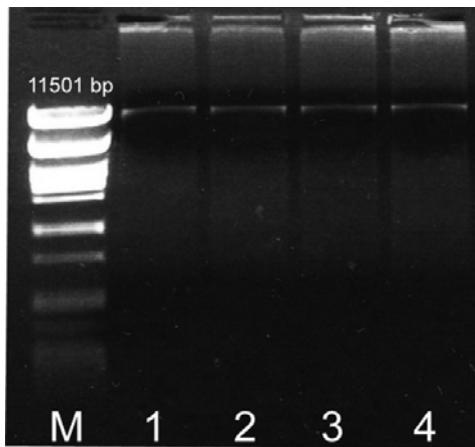


Slika 7. (a) Jamsko srebro v Pajšarjevi jami; (b) Mikrobnna združba od blizu, kjer se vidi sama tekstura biofilma na kamniti osnovi.

4.1.2 Priprava klonskih knjižnic

4.1.2.1 Osamitev skupne mikrobne DNA iz vzorca jamskega biofilma v Pajšarjevi jami

Skupno mikrobno DNA iz vzorca mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve jame smo osamili z uporabo komercialnega kompleta 'PowerSoil DNA Isolation Kit' in 'Ultra Clean Soil DNA Kit' (MoBio, ZDA), vendar smo z uporabo 'PowerSoil DNA Isolation Kit' dobili boljše rezultate in zato smo naprej v rutini delali le s tem. Osamljeno DNA smo do uporabe shranili pri 4 °C. Čistost in količino izolirane skupne mikrobne DNA smo ugotavljali spektrofotometrično. Iz posameznih vzorcev jamskih prevlek (0,12 g) smo dobili DNA v koncentraciji do 10 ng/µl (Slika 8). Čistost DNA smo ocenili s primerjavo razmerja med A₂₆₀ in A₂₈₀. Ker se je le-to gibalo med 1.8 in 2.0 smo ocenili, da je pridobljena DNA dovolj čista za nadaljnje delo.

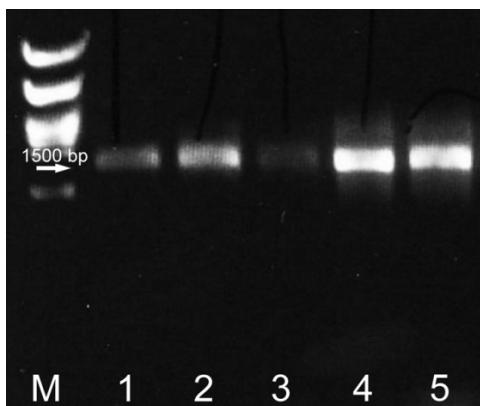


Slika 8. Skupna okoljska DNA iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, ločena v 0,8-odstotnem agaroznem gelu. M-standard velikosti (DNA λ/PstI, Fermentas Life Sciences, Litva); stolpci 1,2,3,4 – izolirana skupna okoljska DNA iz vzorca jamskih prevlek, Pajšarjeva jama.

4.1.2.2 Specifično pomnoževanje genov za 16S rRNA

Izolirano skupno mikrobno DNA smo uporabili kot matrično DNA pri pomnoževanju genov za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo. Za pomnoževanje smo uporabili *Taq* DNA-polimerazo (Fermentas, ZDA). Z začetnima oligonukleotidoma 27F in 1492R smo pomnožili 1500 bp dolg del bakterijskega gena za 16S rRNA. DNA smo pomnoževali po protokolih, ki so jih opisali Macalady in sodelavci v dveh različnih raziskavah (2006, 2007). Večje količine DNA smo dobili pri protokolu, ki so ga opisali Macalady in sod. (2006) (glej poglavje 4.2.2.3), ki smo ga potem naprej rutinsko uporabljali. Produkte verižne reakcije s polimerazo smo ločili v 0,8-odstotnem agaroznem gelu (Slika 9). Produkte smo iz gela očistili s kompletom 'QIAquick PCR Purification Kit' v skladu z navodili proizvajalca (QIAGEN, ZDA) in jih koncentrirali z etanolnimobarjanjem.

Prisotnost arhej v vzorcih smo preverjali z verižno reakcijo s polimerazo in za arheje specifičnima začetnima oligonukleotidoma Arch21F in Arch 958R. Ob tem smo uporabili protokole, ki so jih opisali DeLong (1992) in Arahal in sod. (1996). V vseh primerih pomnoženega fragmenta nismo dobili, če smo kot matriko uporabili skupno mikrobnno DNA vzorcev prevlek sten Pajšarjeve Jame. Zato smo možnost, da so v vzorcih prisotne arheje, izključili.



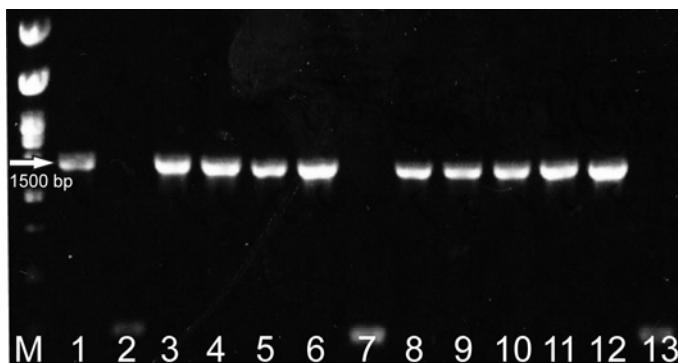
Slika 9. Z reakcijo s polimerazo pomnoženi deli genov za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, po elektroforetski ločitvi v 0,8 odstotnem agaroznem gelu. M-standard velikosti (DNA λ/PstI, Fermentas Life Sciences, Litva); stolpci 1,2,3,4,5 - pomnoženi 1500 bp dolgi deli genov za 16S rRNA.

4.1.2.3 Priprava in analiza klonskih knjižnic

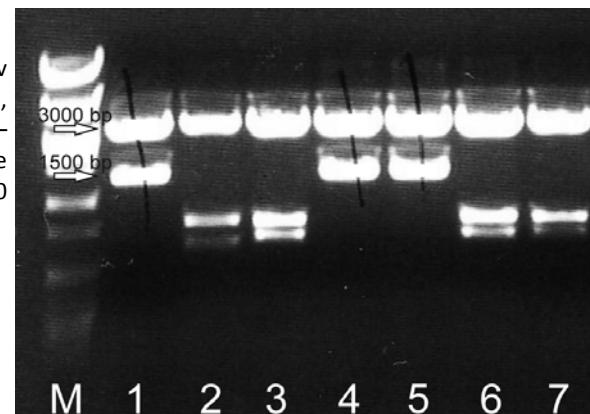
Očiščene dele genov za 16S rRNA, pomnožene iz skupne mikrobine DNA jamskih prevlek v Pajšarjevi jami smo naključno klonirali v vektor pGEM® T-Easy s pomočjo komercialnega kompleta 'pGEM® T Vector System II' (Promega, ZDA). Tako pripravljene rekombinantne plazmide smo vnesli v komercialno pripravljene celice seva *E. coli* JM101, ki omogočajo prepoznavanje za vključke pozitivnih klonov z α-komplementacijo. Da bi kar najbolj zajeli mikrobnno raznolikost, smo izdelali šest knjižnic gena za 16S rRNA jamskih prevlek Pajšarjeve Jame.

Klone, ki so vsebovali vključke, smo izbirali naključno. Prisotnost vključkov v klonih smo preverjali na dva načina. Pri preverjanju z verižno reakcijo s polimerazo (Slika 10) smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo in začetna oligonukleotida SP6 in T7, ki sta prilegala zaporedjem ob poliklonskem mestu plazmida pGEM® T-Easy. Pri preverjanju z rezanjem DNA, smo izolirano plazmidno DNA razrezali z encimom EcoRI, ki reže ob poliklonskem mestu plazmida pGEM® T-Easy (Slika 11). Potrjene klone smo gojili do stacionarne faze rasti in plazmidno DNA, skupno 280 klonov izolirali s pomočjo kompleta 'Wizard Plus SW Minipreps' (Promega, ZDA). Nukleotidno zaporedje vključkov 280 klonov šestih klonskih

knjižnic gena za 16S rRNA so ugotovili v podjetju Macrogen (Seoul, Koreja) z uporabo začetnih oligonukleotidov 27F in 1492R.



Slika 10. Preverjanje prisotnosti pomnoženih delov gena za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, v DNA pGEM® T-Easy z verižno reakcijo s polimerazo. M – standard velikosti (DNA λ/PstI, Fermentas Life Sciences, Litva); stolci 1 -13 – pomnoženi 1500 bp veliki vključki knjižnice 16S rRNA.



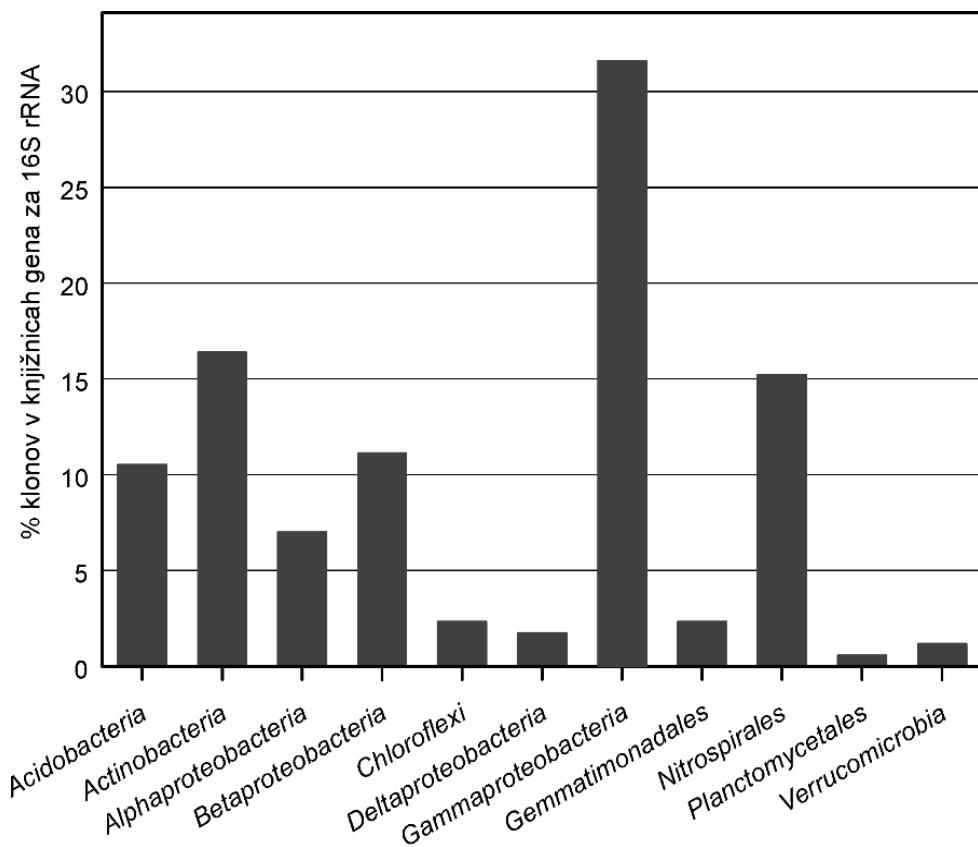
Slika 11. Preverjanje prisotnosti pomnoženih delov gena za 16S rRNA, iz jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, z rezanjem plazmidne DNA z encimom EcoRI. M – standard velikosti (DNA λ/PstI, Fermentas Life Sciences, Litva); stolci 1,4,5 – plazmid velikosti 3000 bp in sproščen fragment velik 1500 bp.

4.1.2.4 Splošna filogenetska raznolikost in vrstna bogatost v vzorcih jamskih prevlek Pajšarjeve Jame

Pridobljena nukleotidna zaporedja delov gena za 16S rRNA smo uredili v programske orodju Sequencher (Gene Codes, Ann Arbor, ZDA) in iz analize izključili zaporedja slabše kvalitete. Prisotnost himernih zaporedij DNA smo opredelili z uporabo strežnika Bellerophon (Schloss in Handelsman, 2005). Za analizo Bellerophon smo uporabili velikostno okno (200 - 400 bp) in korekcijo Huber-Hugenholtz. Skupno smo prepoznali 30 himernih zaporedij, ki smo jih izključili iz nadaljnje analize (Huber in sod., 2004).

Na ta način smo opredelili 171 delnih (800 bp) zaporedij gena za 16S rRNA visoke kvalitete, ki smo jih vključili v analizo. Sprva smo zaporedja primerjali s podobnimi zaporedji, dostopnimi v podatkovni zbirki GenBank, z uporabo algoritma BLASTN. Raznolikost mikrobov je bila visoka, saj smo lahko zaporedja uvrstili v osem bakterijskih debel (≤ 20 odstotkov razlike v podobnosti zaporedij). V vzorcu mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve Jame

so bili daleč najbolj pogosti predstavniki debla *Proteobacteria* (predvsem razred *Gammaproteobacteria*) in *Actinobacteria*. Po pogostnosti pojavljanja so sledila zaporedja, ki smo jih uvrstili v debla *Nitrospira*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadales*, *Verrucomicrobia* in *Planctomycetales* (Slika 12).



Slika 12. Razširjenost posameznih bakterijskih debel v knjižnicah gena za 16S rRNA iz okolske DNA, osamljene iz vzorcev mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve Jame (Slovenija).

S programskim orodjem DOTUR smo opredelili ocene raznolikosti mikrobov (cenilka Shannon; H'), dominance (Simpson) in vrstne bogatosti (cenilki ACE in Chao 1). Ceniki Simpson in Shannon upoštevata vrstno bogatost in relativno razširjenost opaženih taksonov. Pri cenilkah Chao1 in ACE pričakujemo višje vrednosti, saj cenilki ocenita število vrst v preiskovanem habitatru pri čem upoštevata predvsem taksone, ki se v vzorcu pojavijo le enkrat. Ocene smo opredelili pri 3-odstotni, 5-odstotni in 20-odstotni razlikah v evolucijskih razdaljah, ki jih lahko imamo za približke bakterijske vrste, rodu in debla (Preglednica 2). Ocene raznolikosti so pokazale, da je vrstna pestrost v vzorcih visoka. Dobljene vrednosti cenilk raznolikosti so primerljive z vrednostmi, ki so jih opisali za tla in so že dolgo znana kot vrstno bogat habitat (Ge in sod., 2008) ter daleč presegajo vrednosti, ki so jih opisali v

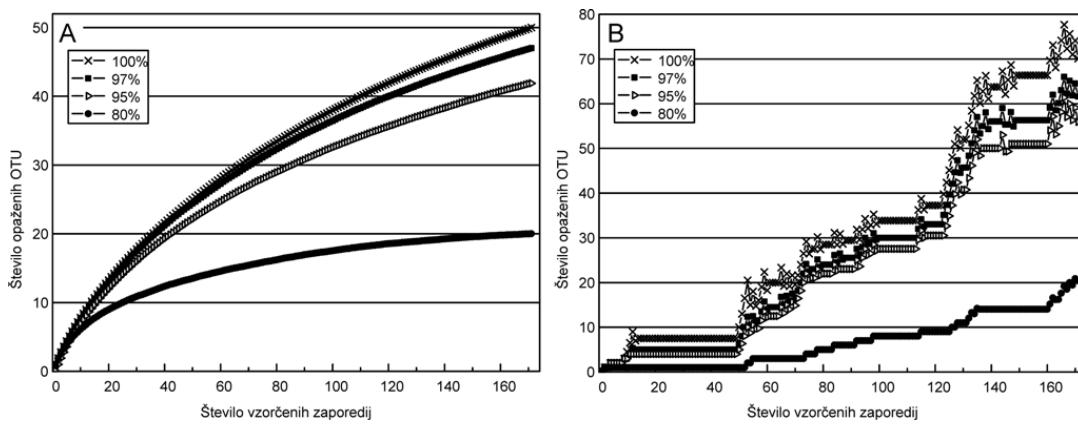
skrajnih okoljih (npr. vrednost cenilke Shannon je v skrajno slani vodi solin bila 0,5; Pašić in sod. 2007). Ti podatki nakazujejo, da gre za s hranili bogat habitat, ki omogoča življenje velikemu številu različnih mikroorganizmov.

Preglednica 2. Ocene raznolikosti mikrobov jamskih prevlek v Pajšarjevi jami, ugotovljene pri 3-, 5- in 20-odstotni razliki v evolucijskih razdaljah, kot je implementirano v programskev orodju DOTUR.

Ocena raznolikosti	Jamska prevleka		
	97% podobnost	95% podobnost	80% podobnost
	± CI (5%)	± CI (5%)	± CI (5%)
Raznolikost (Simpson)	0,07	0,08	0,14
Dominanca (Shannon)	3,19±0,19	3,05±0,19	2,32±0,16
Vrstna bogatost (ACE)	69,40±13,20	67,00±14,90	20,24±1,84
Vrstna bogatost (Chao1)	62,80 ±20,50	57,30± 21,10	20,40 ±2,70

CI (5%) – 5% interval zaupanja

Z rarefakcijsko krivuljo smo ugotavljali, ali je vzorec 171 klonov iz knjižnic gena za 16S rRNA zajel vrstno pestrost vzorca (Slika 13). Opazimo lahko, da gre za zelo raznoliko združbo, saj pri vloženem naporu krivulje ne dosežejo jasne asymptote, ne pri 20-odstotni razliki v evolucijskih razdaljah (približek bakterijskega debla), ne pri 5-odstotni razliki v evolucijskih razdaljah (približek bakterijskega rodu) in ne pri 3-odstotni razliki v evolucijskih razdaljah (približek bakterijske vrste). Podoben trend smo opazili tudi pri zbiralčevi krivulji ocene bogatosti Chao 1 (Slika 13). Zato predvidevamo, da bi dodatno vzorčenje pokazalo večjo mikrobno raznolikost.



Slika 13. Rarefakcijska krivulja (A) in zbiralčeva krivulja cenilke Chao 1 (B) zaporedij gena za 16S rRNA mikrobnih prevlek v Pajšarjevi jami. Rarefakcijska krivulja in 1 ocena vrstnega bogastva Chao sta izračunani pri evolucijski razdalji 0-, 3-, 5- in 20-odstotkov.

4.1.2.5 Analiza nukleotidnih zaporedij fragmentov gena za 16S rRNA

Pri analizi nukleotidnih zaporedij fragmentov gena za 16S rRNA smo zaporedja najprej razdelili v operacijske taksonomske enote (OTU). Zaporedja smo imeli za različna, če so se ločila v evolucijskih razdaljah za več kot 3-odstotke. Matriko evolucijskih razdalj po Kimurinem dvoparametričnem modelu smo izračunali z uporabo programskega orodja DNADIST, ki je del programskega paketa PHYLIP (Felsenstein, 2001). Predstavnike OTU smo poiskali z algoritmom najboljšega soseda programskega orodja DOTUR (Schloss in Handelsman, 2005). Znotraj vzorca 171 delnih zaporedij gena za 16S rRNA smo prepoznali 50 OTU. Za filogenetsko analizo smo iz vsake prepoznane OTU izbrali enega predstavnika in ugotovili nukleotidno zaporedje vključka v obe smeri. Nukleotidna zaporedja, ki so najbolj podobna posameznim predstavnikom OTU, so predstavljena v Preglednici 3.

Preglednica 3. Seznam nukleotidnih zaporedij gena za 16SrRNA v podatkovnih zbirkah, ki so najbolj podobna nukleotidnim predstavnikom OTU, ki smo jih zasledili v Pajšarjevi jami.

Predstavnik OTU	Najbolj podobna nukleotidna zaporedja v podatkovnih zbirkah		Odstotek podobnosti
1PJM294 (FJ535064)	Uncultured bacterium clone FFCH2225 (EU134336)		96
2PJM13 (FJ535065)	Uncultured organism clone GASP-OKA-561-A11(EU043535)		97
2PJM57 (FJ535066)	Uncultured bacterium PHOS-HD29(AF314427)		92
3PJM100 (FJ535067)	Uncultured bacterium clone JH-WH224(EF492889)		99
3PJM129 (FJ535068)	Uncultured gamma proteobacterium partial(FM877668)		92
3PJM137 (FJ535069)	Uncultured Xanthomonadales bacterium clone Plot29-2F04(EU202845)		97
3PJM140 (FJ535070)	Uncultured Myxococcales bacterium clone Plot21-A10(EU193072)		94
3PJM14 (FJ535071)	Uncultured bacterium clone P0X3b5C05(EU491387)		94
3PJM150 (FJ535072)	Uncultured bacterium clone 2C229409(EU801093)		95
3PJM159 (FJ535073)	Uncultured Chromatiales bacterium clone Plot03-2B02(EU276552)		97
3PJM1 (FJ535074)	Uncultured Pseudomonadales bacterium clone Plot21-G11(EU193058)		98
3PJM42 (FJ535075)	Uncultured bacterium clone ORCA-17N118 (DQ823220)		99
3PJM53 (FJ535076)	Uncultured bacterium clone EPR4059-B2-Bc22(EU491533)		96
3PJM60 (FJ535077)	Uncultured soil bacterium clone PYR10d5 (DQ123669)		96
3PJM72 (FJ535078)	Uncultured bacterium clone ORCA-17N118 (DQ823220)		97
3PJM78 (FJ535079)	Uncultured bacterium clone FFCH15553		95

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3. Seznam nukleotidnih zaporedij gena za 16SrRNA v podatkovnih zbirkah, ki so najbolj podobna nukleotidnim predstavnikom OTU, ki smo jih zasledili v Pajšarjevi jami.

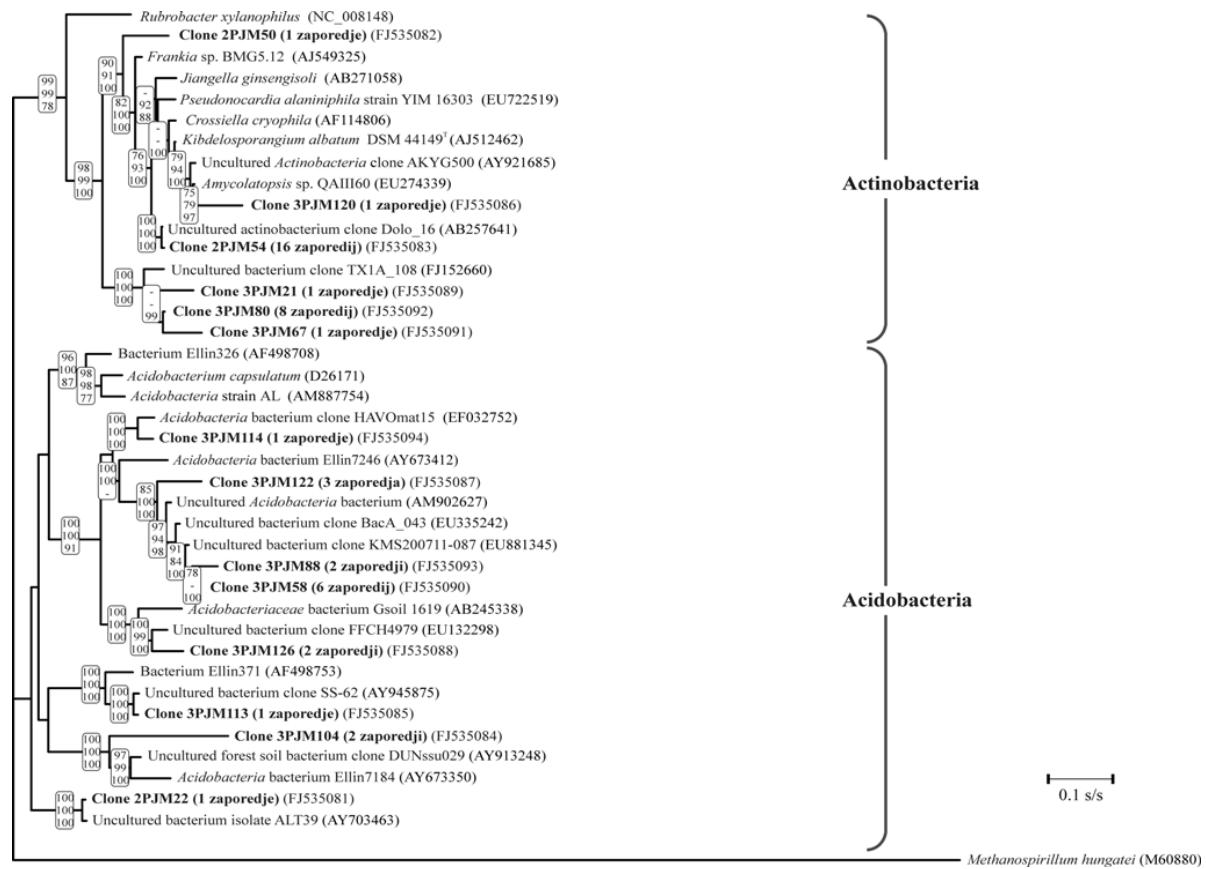
Predstavnik OTU	Najbolj podobna nukleotidna zaporedja v podatkovnih zbirkah		Odstotek podobnosti
2PJM22	(FJ535081)	Uncultured bacterium isolate ALT39	98
2PJM54	(FJ535083)	Uncultured actinobacterium gene for 16S rRNA(AB257641)	98
3PJM104	(FJ535084)	Uncultured forest soil bacterium clone DUNssu029 (AY913248)	94
3PJM113	(FJ535085)	Uncultured bacterium clone SS-62 (AY945875)	98
3PJM120	(FJ535086)	Amycolatopsis sp. QAII160 (EU274339)	92
3PJM122	(FJ535087)	Uncultured Acidobacteria bacterium partial (AM902627)	91
3PJM126	(FJ535088)	Uncultured bacterium clone FFCH4979 (EU132298)	91
3PJM58	(FJ535090)	Uncultured bacterium clone KMS200711-087 (EU881345)	97
3PJM67	(FJ535091)	Uncultured bacterium clone TX1A_83(FJ152635)	91
3PJM80	(FJ535092)	Uncultured bacterium clone TX1A_108 (FJ152660)	93
3PJM88	(FJ535093)	Uncultured bacterium clone BacA_043 (EU335242)	94
3PJM114	(FJ535094)	Uncultured Acidobacteria bacterium clone HAVomat15 (EF032752)	94
1PJM279	(FJ535096)	Uncultured bacterium clone FFCH7272 (EU133997)	97
2PJM17	(FJ535097)	Uncultured bacterium clone CV22 (DQ499282)	96
3PJM118	(FJ535098)	Uncultured bacterium clone FFCH13494 (EU135452)	89
3PJM141	(FJ535099)	Uncultured bacterium clone 5-48b (AY955088)	94
3PJM160	(FJ535100)	Uncultured bacterium clone CV82(DQ499318)	99
3PJM46	(FJ535101)	Uncultured Nitrospira sp. clone Joinville8 (FJ236034)	99
3PJM51	(FJ535102)	Uncultured bacterium clone 1013-28-CG51 (AY532586)	94
3PJM52	(FJ535103)	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA(AB240237)	94
3PJM74	(FJ535104)	Uncultured bacterium clone CV22 (DQ499282)	97
3PJM119	(FJ535105)	Uncultured bacterium clone FCPS411 (EF516709)	96
3PJM125	(FJ535106)	Uncultured bacterium clone BacC-s_023 (EU335200)	98
3PJM12	(FJ535107)	Uncultured beta proteobacterium (FM253568)	99
3PJM155	(FJ535108)	Uncultured bacterium clone 1-13 (AY548937)	94
3PJM33	(FJ535109)	Uncultured bacterium clone S23_830 (EF572731)	96
3PJM45	(FJ535110)	Uncultured beta proteobacterium (FM253602)	98

4.1.3 Filogenetska analiza genov za 16S rRNA skupne mikrobne DNA vzorcev mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame

Nukleotidna zaporedja predstnikov vseh OTU smo poravnali z njim najbolj podobnimi nukleotidnimi zaporedji iz podatkovnih zbirk, ter z zaporedji predstnikov *Bacteria*. Kot zunanjou skupino smo uporabili nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA metanogene arheje *Methanospirillum hungatei*. Za izdelavo filogenetskih dreves smo uporabili metodo največjega verjetja (ang. 'maximum likelihood') in kriterij varčnosti (ang. 'parsimony'). Ponovljivost vozlišč v drevesih smo ocenili z metodo samovzorčenja pri 1000 ponovitvah in Bayesovimi posterironimi verjetnostmi. Vsa drevesa so imela podobno osnovno topologijo, s podobno podporo razvezitve. Zato smo v vseh primerih predstavili drevo največjega verjetja, ki smo mu dodali vrednosti samovzorčenja pri 1000 ponovitvah in posteriorne verjetnosti posameznih razvezitev. Filogenetska analiza nukleotidnih zaporedij predstnikov 50 OTU, ki smo jih prepoznali v naključno izbranem vzorcu 280 klonov knjižnic 16S rRNA, pripravljenih iz skupne DNA mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame, je pokazala prisotnost 43 skupin. Skupine smo ocenili na podlagi najmanj izključujoče monofilije, kot jo sestavljajo nukleotidna zaporedja Pajšarjeve jame in najbližji sorodniki iz podatkovnih baz.

4.1.3.1 *Actinobacteria* in *Acidobacteria*

Kar 16 odstotkov nukleotidnih zaporedij, pridobljenih v tej študiji, smo filogenetsko uvrstili v deblo *Actinobacteria* (Slika 14). Predstavniki tega debla so bili druga najbolj zastopana skupina v vzorcu jamskih prevlek. S filogenetsko analizo smo ugotovili, da nukleotidna zaporedja tvorijo štiri skupine, od katerih sta dve zastopani z več kot enim nukleotidnim zaporedjem. Ugotovili smo, da stene Pajšarjeve jame naseljujejo novi, še neopisani filotipi *Actinobacteria*, ki so le slabo podobni zaporedjem, prisotnim v podatkovnih zbirkah (88 – 93 odstotkov podobnosti zaporedjem v podatkovni zbirki GenBank). Nukleotidni zaporedji klonov 3PJM100 in 2PJM50 smo lahko uvrstili v rodova *Amycolatopsis* in *Frankia*, medtem ko so se preostala zaporedja vejila iz skupnega vozlišča kot samostojne linije. Ta zaporedja so bila najbolj podobna zaporedjem, ki so jih opisali v alpskih dolomitih (klon 2PJM54, 98 odstotkov podobnosti, 9 odstotkov pridobljenih zaporedij) in zaporedjem, ki so jih opisali v bazičnih slanih tleh jezera Texcoco v Mehiki (kloni 3PJM21, 3PJM80, 3PJM67).



Slika 14. Drevo največjega verjetja (maximum likelihood). Odebeljeno so prikazani predstavniki posameznih OTUs, ki pripadajo predstavnikom *Acidobacteria* in *Actinobacteria*, odkritih v jamskih prevlekah iz Pajšarjeve jame.

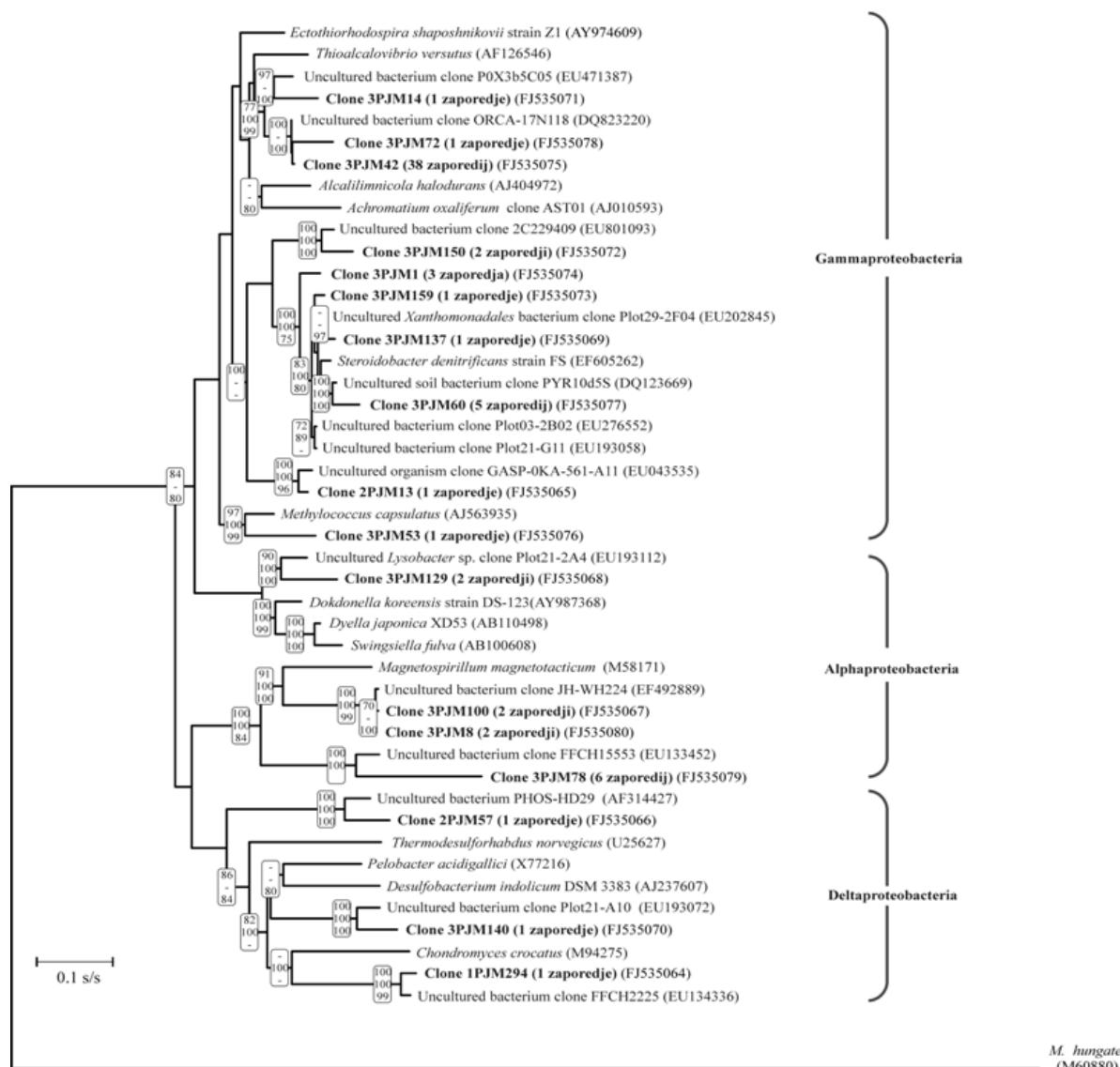
V deblo *Acidobacteria* uvrščamo številne filotipe, ki so jih osamili iz tal in sedimentov. Ugotovili smo, da so *Acidobacteria* zmerno razširjene v prevlekah Pajšarjeve jame, saj so predstavniki predstavljeni 10,5 odstotkov analiziranega vzorca. *Acidobacteria* je pred kratkim opisano monofletsko deblo znotraj *Bacteria* in so doslej v čisti kulturi uspeli osamiti le pečico predstavnikov. Zato ne preseneča, da zaporedja, pridobljena v tej študiji, niso bila sorodna nobeni, doslej opisani vrsti. Še več, pridobljena zaporedja so bila filogenetsko zelo raznolika. Prepoznavali smo kar devet OTU, od katerih jih je sedem v ≤ 95 odstotkih podobno doslej opisanim zaporedjem. Ti rezultati nakazujejo, da je združba *Acidobacteria* v Pajšarjevi jami drugačna od doslej opisanih združb.

4.1.3.2 *Proteobacteria*

Pripadniki debla *Proteobacteria* so ekološko zelo uspešni in zato zelo razširjeni v knjižnicah gena za 16S rRNA. Tako so tudi v genetskih knjižnicah skupne DNA jamskih prevlek predstavljeni kar 51,4 odstotkov preiskanih zaporedij. Znotraj *Proteobacteria* smo najbolj

pogosto opazili zaporedja razreda *Gammaproteobacteria* (Slika 15). Le-ta so predstavljala 31,4 odstotkov vseh preiskanih zaporedij. Filogenetska analiza je pokazala, da lahko večino teh zaporedij uvrstimo v škrlatne bakterije (red *Chromatiales*). Zanimivo je, da so bila naša zaporedja najbolj sorodna zaporedjem (96 – 99 odstotkov podobnosti), ki so jih opisali v jamskem okolju jam Oregon v ZDA (klon ORCA-17N118, DQ823220, Slika 15). Znotraj razreda *Gammaproteobacteria* smo opazili tudi raznoliko skupino, ki je sorodna talnim in sladkovodnim predstavnikom redu *Xantomonadales* (Slika 15, kloni 3PJM1, 3PJM159, 3PJM60.)

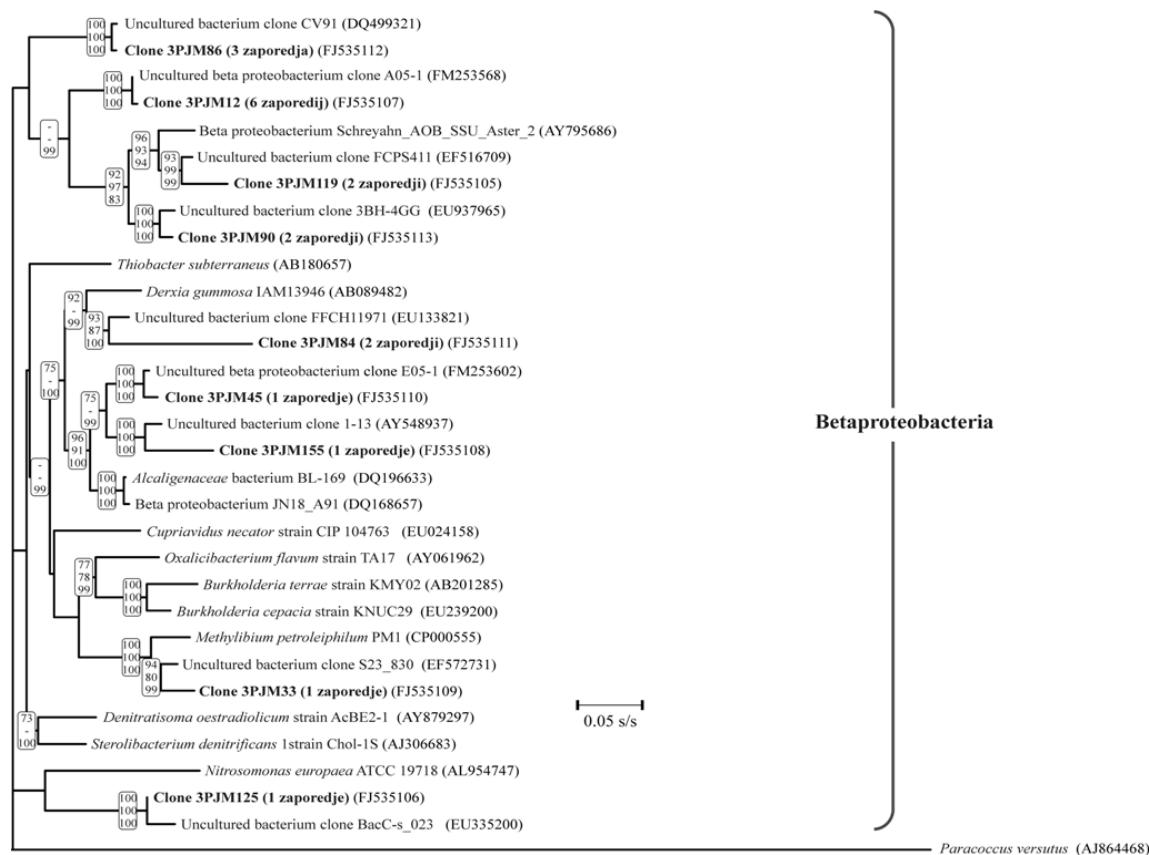
Predstavnike razreda *Alphaproteobacteria* smo le redko osamili v knjižnicah gena za 16S rRNA Pajšarjeve Jame. V skupino smo filogentsko uvrstili le peščico zaporedij, ki so bila sorodna okoljskim zaporedjem DNA, ki so jih opisali v rastlinskih nodulih (Slika 15, kloni 3PJM100, 3PJM8) in prerijskih tleh (klon 3PJM78). Podoben vzorec razširjenosti smo opazili pri *Deltaproteobacteria*, kamor uvrščamo anaerobne, sulfat reducirajoče bakterije. V to skupino smo vključili samo tri OTU (kloni 2PJM57, 3PJM57 in 1PJM294), ki so bili vsi sorodni drugim okoljskim zaporedjem. Predstavnikov *Epsilonproteobacteria* nismo zasledili v naših knjižnicah.



Slika 15. Drevo največjega verjetja (maximum likelihood). Odebeljeno so prikazani predstavniki posameznih OTUs, ki pripadajo predstavnikom *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* in *Deltaproteobacteri*, odkritih v jamskih prevlekah iz Pajšarjeve jame.

V razred *Betaproteobacteria* (Slika 16) smo uvrstili skupno 10,5 odstotkov vseh analiziranih zaporedij. Zaporedja, sorodna *Betaproteobacteria*, so bila zelo raznolika in so oblikovala devet OTU. Najbolj pogosto smo osamili zaporedja, ki so bila sorodna zaporedjem kamnitih biofilmov rudnika zlata na Poljskem (klon A05-1, FM253568) in zaporedjem, pridobljenim iz kislih, visečih mikrobnih prevlek jamskega sistema Frasassi v Italiji (klon CV91, DQ499321, Macalady in sod., 2007). Le dve zaporedji sta bili sorodni doslej opisanim vrstam *Betaproteobacteria*. Nukleotidno zaporedje klena 3PJM33 se je vejilo skupaj s predstavnikom rodu *Methylibium*, nukleotidno zaporedje klena 3PJM125 pa z *Nitrosomonas europea*.

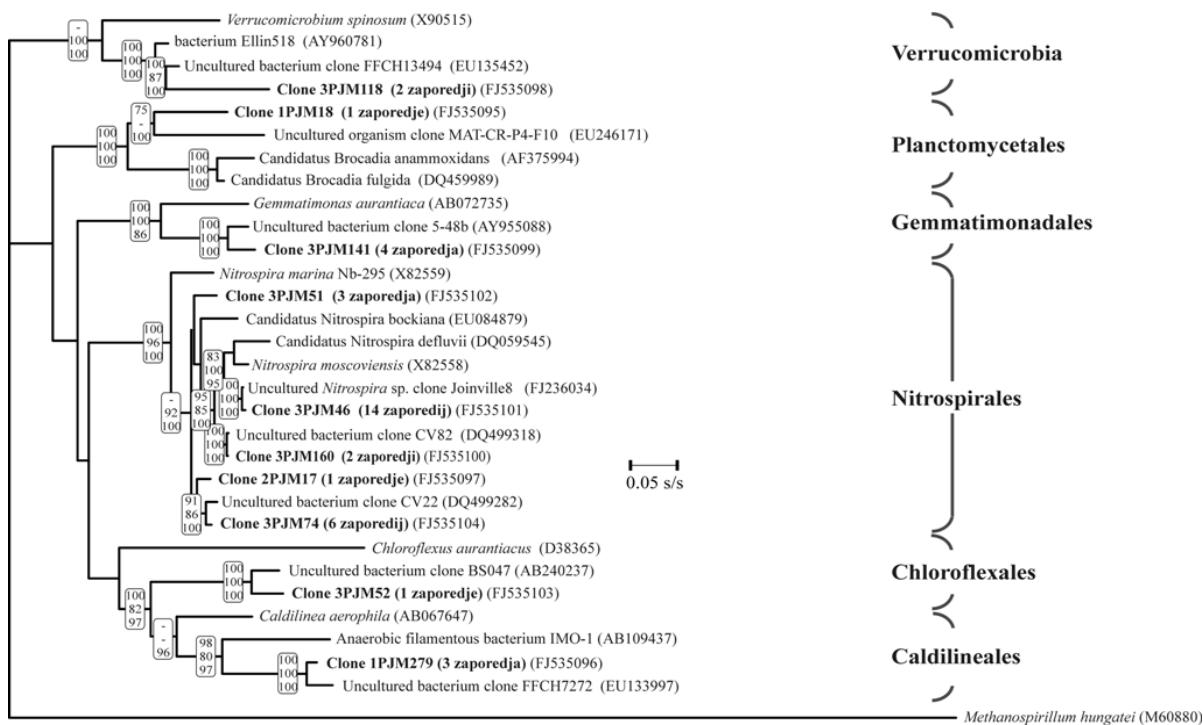
Preostala zaporedja niso bila podobna nobeni, doslej opisani vrsti in so bila v 94 – 99 odstotkih podobna okoljskim zaporedjem, ki so jih opisali v tleh.



Slika 16. Drevo največjega verjetja (maximum likelihood). Odebeljeno so prikazani predstavniki posameznih OTUs, ki pripadajo predstavnikom *Betaproteobacteria*, odkritih v jamskih prevlekah iz Pajšarjeve jame.

4.1.3.3 *Verrucomicrobia*, *Planctomycetales*, *Gemmatimonodales*, *Nitrospirales* in *Chloroflexi*

Preostala zaporedja smo uvrstili v debla *Verrucomicrobia*, *Planctomycetales*, *Gemmatimonodales*, *Nitrospirales* in *Chloroflexi* (Slika 17). Zaporedja, ki jih predstavlja nukleotidno zaporedje klona 3PJM118 so bila sorodna *Verrucomicrobium spinosum*, ki ga pogosto najdemo v s hranili bogatih sladkih vodah. Znotraj *Gemmatimonodales* smo uvrstili zaporedja, ki jih predstavljajo zaporedje klona 3PJM51, ki so sorodna vrsti *Gemmatimonas aurantiaca*. Tri zaporedja so bila filogentsko sorodna *Caldilineales* in po eno *Chloroflexales* in *Planctomycetales*.



Slika 17. Drevo največjega verjetja (maximum likelihood). Odebeljeno so prikazani predstavniki posameznih OTUs, ki pripadajo predstavnikom *Verrucomicrobia*, *Planctomycetales*, *Gemmatimonadales*, *Nitrospirales*, *Chloroflexales* in *Caldilineales*, odkritih v jamskih prevlekah iz Pajšarjeve jame.

Posebej zanimiva so zaporedja sorodna deblu *Nitrospira*. Le-ta so bila v naših knjižnicah pogosta in so predstavljala 15,2 odstotkov analiziranih zaporedij. Skupina je bila zelo raznolika. Prepoznali smo kar pet OTU, ki so bile sorodne zaporedjem *Nitrospira*, osamljenim v vodi (klon 3PJM46) ter zaporedjem iz jam Frassasi v Italiji (kloni 3PJM74, 3PJM160, 2PJM17).

5 RAZPRAVA

Z izrazom mikrobnna raznolikost v znanstvenih in poljudnih krogih opisujemo popis vrst mikrobov v določenem habitatu ali ekosistemu. Bolj zapletene definicije opisujejo raznolikost kot tisto lastnost področja, ki se specifično nanaša na različnost znotraj in med živimi organizmi, v združbah živilih organizmov, naravnih ali antropogeno spremenjenih biotskih skupnosti ter biotskih procesih (DeLong, 1997). Mikrobnno raznolikost lahko merimo v smislu genetske raznolikosti, identitete ter števila mikrobnih vrst, mikrobnih združb, biotskih skupnosti in biotskih procesov ter deleža (razširjenosti, biomase) posameznih vrst ter strukture naštetega (Rodríguez-Valera, 2002).

Mikrobne prevleke, ki jih najdemo na površini sten karbonatnih jam Dinarskega kraša so bile doslej slabo raziskane. Pionirskim raziskavam Megušarja in Sketa (1973), ki sta vzpostavila organsko naravo prevlek in v čisti kulturi osamila pripadnike *Actinobacteria*, je sledilo tridesetletno obdobje molka. V diplomski nalogi smo si zato prizadevali opisati strukturo mikrobnne združbe, ki naseljuje raznobarvne mikrobnne prevleke v Pajšarjevi jami pri Vrhniku. Pajšarjevo jamo smo si izbrali, ker je izjemno bogata s prevlekami in je le redko obiskovana.

5.1 VZORČENJE IN LASTNOSTI VZORCA

V Pajšarjevi jami smo si za vzorčenje izbrali vhodno galerijo do sifona, ki preprečuje dostop do globljih delov Jame. Mikrobne prevleke, ki na značilen način odsevajo svetlobo, smo opazili po stenah in stropu toda ne v vodi. V Pajšarjevi jami smo najpogosteje opazili kolonije roza barve, ki so se večinoma pojavljale kot posamezne kolonije v neposredni bližini jamskega vodotoka. Kolonije bele barve so bile naslednje po pogostnosti pojavljanja in smo jih zasledili predvsem na stropu Jame. Zasledili smo jih tudi v nižjih predelih jamskih sten, vendar v precej manjšem številu in večinoma v razpokah, na robovih sten in tudi med kapniki. Sive kolonije so pogosto rastle skupaj z rožnatimi in le redko posamično. Tudi rumene kolonije so bile pogoste v Pajšarjevi jami. Opazili smo jih večinoma v višjih predelih sten Jame, največkrat pa ob robovih in razpokah jamskih sten. Jamo smo obiskali še večkrat in opazili spremembe v rasti kolonij. Tako se je v obdobju med marcem in majem 2010 razporeditev kolonij v Pajšarjevi jami povsem spremenila in so preraščale druge, prej gole, dele Jame.

Ob pregledu s stereomikroskopom smo ugotovili, da se raznobarvne kolonije v vzorcih sten Pajšarjeve jame pogosto medsebojno prepletajo. Ob pregledu s fazno-kontrastnim mikroskopom smo ugotovili, da so odvzeti vzorci morfološko heterogeni. Opazili smo paličaste in koidne oblike, najpogosteje pa razvezjane nitke, ki morfološko spominjajo na predstavnike *Actinobacteria*. Da bi čim bolj zajeli raznolikost mikrobov, ki sestavljajo prevleke, smo vzorčili in analizirali morfološko najbolj heterogene dele jamskih prevlek. Morfološko so bili vzorci mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve jame podobni vzorcem rumenih kolonij, ki so jih našli na stenah jame Altamira v Španiji (Cuezva in sod., 2009). Oba tipa kolonij imata še eno skupno lastnost. Iz Altamire so poročali, da rumene kolonije adsorbirajo vodne hlapne in jih zadržijo dolgo časa, ter da delujejo kot kondenzacijski centri (Cuezva in sod., 2009).

5.2 UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE NA PODLAGI PRIMERJAVE NUKLEOTIDNIH ZAPOREDIJ IZ KLONSKIH KNJIŽNIC

5.2.1 Splošna raznolikost zaporedij v klonskih knjižnicah

V tej študiji smo pridobili 171 visokokvalitetnih zaporedij gena za 16S rRNA, ki smo jih pomnožili iz skupne DNA mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame. Zaporedja smo razdelili v operacijske taksonomske enote in pri tem smo kot približek vrste uporabili 3-odstotno razliko v evolucijskih razdaljah, kot približek rodu 5-odstotno razliko v evolucijskih razdaljah in kot približek debla 20-odstotno razliko v evolucijskih razdaljah (Schloss in Handelsman, 2005). Pridobljeno število OTU je bilo visoko in je nakazalo, da je vrstna pestrost v jamah visoka. Ravno tako smo z izrisom rarefakcijske krivulje opazili odsotnost jasne asymptote pri vseh razlikah v evolucijskih razdaljah. Zato smo sklepali, da bi dodatno vzorčenje pokazalo še večjo pestrost vzorca. Ta predvidevanja smo potrdili z izračunom cenilk raznolikosti. Le-te so bolj primerljive z vrednostmi, ki so jih opazili v vrstno bogatih okoljih. Tako so vrednosti cenilk primerljive z vrednostmi, ki so jih opisali za tla, ki so že dolgo znana kot vrstno bogat habitat (Ge in sod., 2008) in presegajo vrednosti, ki so jih opisali v vodnih habitatih (Briee in sod., 2007) ter v skrajnih okoljih (npr. vrednost cenilke Shannon je v skrajno slani vodi solin bila 0,5; Pašić in sod. 2007). Naši rezultati tako kažejo, da iz stališča mikroorganizmov, Pajšarjeva jama ne predstavlja skrajni sistem, temveč da gre za s hranili bogat habitat, ki omogoča življenje velikemu številu različnih mikroorganizmov.

Omenimo naj, da smo preverjali tudi prisotnost arhej v okoljski DNA mikrobnih prevlek sten Pajšarjeve jame. V ta namen smo uporabili dva kompleta za arheje specifičnih začetnih oligonukleotidov in standardne pogoje pomnoževanja (glej poglavje 3.1.6.2). V obeh primerih nam ni uspelo pomnožiti arhejskih genov za 16S rRNA. Zato smo sklepali, da z uporabljenou metodologijo nismo uspeli pokazati prisotnost arhej v našem vzorcu. Naši rezultati tako nasprotujejo rezultatom Gonzalesa in sodelavcev (2006), ki so opisali metabolno aktivne psihrofilne *Crenarchaeota* v prevlekah sten jame Altamira v Španiji.

5.2.2 Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA kot filogenetski označevalec

Nukleotidna zaporedja gena za 16S rRNA se že vrsto let uporabljamjo kot splošni filogenetski označevalec. Geni za 16S rRNA nosijo zapis za podenoto ribosoma, zato so prisotni v vseh organizmih in so funkcijsko ohranjeni. Tudi dolžina molekule 16S rRNA (1500 bp) zadošča, da bi jo imeli za informativno in vsebuje tako evolucijsko ohranjena območja kot tudi področja visoke variabilnosti (Ludwig in sod., 1998). Uporabnost gena za 16S rRNA kot filogenetskega označevalca omejuje prisotnost več kopij gena pri nekaterih organizmih. Le-te so pogosto zelo divergentne, kot so poročali pri *Clostridium paradoxum* (Reiney in sod., 1996) ter *Paenibacillus polymyxa* (Nübel in sod., 1996). Treba je omeniti tudi, da visoka podobnost v nukleotidnih zaporedjih gena za 16S rRNA ne pomeni nujno tudi visoke podobnosti nukleotidnih zaporedij genomov primerjanih organizmov. Nukleotidna zaporedja celotnih genomov so si lahko bolj podobna kot zaporedja 16S rRNA, velja pa tudi obratno (Rosello-Mora in Amman, 2001).

5.2.3 Filogenetska analiza zaporedij gena za 16S rRNA, osamljenih iz okoljske DNA mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame

V okviru diplomske naloge smo iz okoljske DNA mikrobnih prevlek Pajšarjeve jame pridobili 171 zaporedij 16S rRNA. Te smo, na osnovi podobnosti z drugimi zaporedji v GenBank, pripisali osmim deblom *Bacteria*. Po pogostosti smo prepoznali predstavnike *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospira*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi* in *Gemmatimonadales*, *Verrucomicrobia* in *Planctomycetales* (poglavje 4.1.2.4; Slika 12).

V naših genskih knjižnicah smo najpogosteje osamili pripadnike ekološko uspešnega debla *Proteobacteria* (51,4 odstotkov analiziranih zaporedij). Najpogosteje so bila zaporedja sorodna podrazredu *Gammaproteobacteria* in sicer jamskim škrlatnim žveplovim bakterijam, (klon ORCA-17N118, glej poglavje 4.1.3.2, Slika 15), ki bi lahko bile vpletene v oksidacijo

H_2S v anoksičnih delih mikrobne prevleke. Omenimo naj, da smo opazili tudi pripadnike *Xanthomonadales* (Slika 15, *Gammaproteobacteria*). Le-ti so pogosto obarvani rumeno, zaradi prisotnosti karotenoidov, in bi lahko prispevali k rumenemu obarvanju kolonij. Te domneve potrjujejo raziskave Jame Altamira v Španiji, kjer so pripadnike *Xanthomonadales* opazili izključno v rumenih kolonijah (Portillo in sod., 2008). Zaporedja, filogenetsko sorodna *Betaproteobacteria* so bila ravno tako sorodna zaporedjem, ki so jih opisali v jamah in sicer v visečih mikrobnih prevlekah sulfidne Jame Frassasi v Italiji (Macalady in sod., 2007) in rudniku zlata na Poljskem.

S filogenetsko analizo smo ugotovili, da stene Pajšarjeve Jame poseljujejo novi, prej neznani, predstavniki *Actinobacteria*. Podobnosti gena za 16S rRNA predstavnikov OTE znanim zaporedjem v GenBank so bile nizke in so se gibale med 88 in 93 odstotki. Ravno tako so se v filogenetskih drevesih zaporedja vejila samostojno ter velikokrat globoko, kar nakazuje, da gre morda tudi za pripadnike doslej neopisanega rodu znotraj *Actinobacteria* (glej poglavje 4.1.3.1, Slika 14).

Zaporedja, ki smo jih uvrstili v deblo *Acidobacteria* so bila filogenetsko raznolika in so tvorila osem filogenetskih skupin. Predstavnike debla *Acidobacteria* lahko razdelimo v 11 podskupin (Zimmerman in sod., 2005). Zaporedja, ki smo jih opisali v Pajšarjevi jami, smo lahko uvrstili v podskupini 3 in 4 (glej poglavje 4.1.3.1, Slika 14). Zaporedja, ki so jih uvrstili v podskupini 3 in 4 *Acidobacteria* so opisali tudi v jami Altamira (Španija), medtem ko so pokazali, da kisle sulfidne Jame, kot je jama Kane Lower v ZDA gostijo *Acidobacteria* podskupin 7 in 8 (Meinsinger in sod., 2007).

Doslej so v čisti kulti osamili le redke predstavnike debla *Nitrospira*. Zato ne preseneča, da nam pridobljene OTU ni uspelo pripisati nobeni uradno opisani vrsti. Ugotovili smo, da Pajšarjevo jamo poseljujejo predstavniki *Nitrospira*, ki so filogenetsko sorodni zaporedjem, pridobljenim v sulfidni jami Frassasi v Italiji (Macalady in sod., 2007, glej poglavje 4.1.3.3, Slika 17) ter amonij oksidirajočim predstavnikom *Nitrospira* spp.

5.2.4 Primerjava raznolikosti bakterij v mikrobnih prevlekah sten Pajšarjeve Jame in drugih raziskanih jamah

Stene Pajšarjeve Jame gostijo edinstvene mikrobne prevleke, ki jih doslej še niso preučevali s sodobnimi tehnikami mikrobne ekologije. Rezultati naše raziskave kažejo, da je struktura te mikrobne združbe edinstvena in različna od drugih, doslej opisanih. Doslej raziskani sistemi

pa so si nekoliko bolj podobni glede na vrstno sestavo, še posebej na najbolj grobem nivoju – nivoju bakterijskih debel. V skoraj vseh doslej raziskanih jamah, pa tudi v našem vzorcu, tako prevladujejo pripadniki *Proteobacteria*. *Proteobacteria* so prevladovale v pronicajočih vodah, rumenih, sivih in belih kolonijah in na paleolitskih poslikavah jame Altamira v Španiji, na stenah jame Tito Bustillo v Španiji ter v sedimentih jame Wind Cave v ZDA (Laiz in sod., 1999; Schabereiter-Gurtner in sod., 2002a; Portillo in sod., 2008, 2009, Schabereiter-Gurtner in sod., 2002b; Chelius in Moore, 2004).

Predstavniki *Proteobacteria* so prevladovali tudi v kislih, sulfidnih jamah kot je jama Frassasi v Italiji (Macalady in sod., 2006, 2007), jame Parker, Cesspool in Lower Kane v ZDA ter Movile v Romuniji (Angert in sod., 1998; Sarbu 2000; Engel in sod., 2001, 2003). Ena izmed možnih razlag za tovrstno razširjenost proteobakterij je njihova metabolna raznolikost, saj lahko za rast uporablajo številne različne organske snovi (Palleroni, 1992). K razširjenosti protebakterij bi lahko prispevala tudi dostopnost hrani. Tako so Northup in sod. (2003) ter Ikner in sod. (2006) pokazali, da število proteobakterij v jamah raste s povečanjem števila obiskovalcev. Obiskovalci prispevajo dodatna hrnila preko obutve ter preko odmrlih celic kože in odpadlih las. Nenazadnje naj omenimo, da proteobakterije prevladujejo tudi v ekološko zelo ogroženi jami Lascaux v Franciji (Bastian in sod., 2009).

Predstavniki *Actinobacteria* so bili druga najbolj zastopana skupina v našem vzorcu in sicer v podobnem razmerju, kot so ga opisali v vzorcu izolatov jame Wind Cave, ZDA (Chelius in Moore 2004). *Actinobacteria* gotovo igrajo pomembno vlogo v jamskem ekosistemu. V jahah jih pogosto najdemo v suhih predelih jamskega substrata, pa tudi v namočenih sedimentih in površinah, kjer voda kaplja na kamnino (Laiz in sod., 1999). Številni predvidevajo, da so *Actinobacteria* posredno ali neposredno vključene v biominerizacijske procese v jahah, saj lahko proizvajajo različne tipe kristalov (Laiz in sod., 1999; Barton in sod., 2001; Canaveras in sod., 2001; Groth in sod., 2001 Jones, 2001). V Pajšarjevi jami nastanka kristalov nismo opazili. Opazili pa smo, da je kamnita podlaga, ki jo naseljujejo mikrobne prevleke ponekod trda, ponekod preperela. To opažanje je v skladu z zgodnjimi raziskavami Sketa in Megušarja (1973), ki sta iz podobnih prevlek v Planinski jami v čisti kulturi osamila pripadnike rodov ter pokazala, da izolati *Proactinomyces* aktivno razgrajujejo CaCO₃ in s tem prispevajo k mehčanju podlage.

Raznolikost jamskih *Actinobacteria* je izjemna. Iz jah so doslej v čisti kulturi osamili predstavnike rodov *Arthrobacter*, *Acidimicrobidae*, *Actinosynnemataceae*, *Brevibacterium*,

Frankia, *Kocuria*, *Microbacteriaceae*, *Micrococcaceae*, *Nocardiaceae*, *Nocardoidaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Streptomycetaceae*, *Saccharothrix* in *Rhodococcus* (Groth in Saiz-Jimenez, 1999; Groth in sod., 1999, 2001; Laiz in sod., 1999, 2000; Holmes in sod., 2001; Schabereiter-Gurtner in sod., 2002a; Northup in sod., 2003).

Pripadniki debla *Acidobacteria* so splošno razširjeni v jamskih sistemih a njihova ekološka vloga ostaja neraziskana. Opisali so jih v skoraj vseh doslej raziskanih jamah (Schabereitner-Gurtner in sod., 2002b, 2004, Meinsinger in sod., 2007, Chelius in Moore, 2003, Holmes in sod., 2001) pa tudi v mikrobnih prevlekah Rimskih katakomb (Zimmerman in sod., 2005). Opazimo lahko, da je v primerjavi z drugimi doslej raziskanimi sistemi, razširjenost *Acidobacteria* v vzorcih Pajšarjeve Jame, zmerna. OTU, ki smo jih pripisali *Acidobacteria* so predstavljale 10,5 odstotka preiskanega vzorca.

Predstavniki debla *Nitrospira* so bili v našem vzorcu razširjeni in so predstavljeni kar 15,2 odstotka preiskanega vzorca. Vsi doslej opisani predstavniki *Nitrospira* so obligatni kemolitoavtotrofi, ki energijo za rast dobivajo z oksidacijo nitrita. Ta proces so opisali v podvodni jami v Mehiki, v katero hranila vstopajo na podoben način kot v Pajšarjevo jamo (Pohlman in sod. 1997). Zato predvidevamo, da bi lahko tudi zaporedja okoljske DNA Pajšarjeve Jame pripadala ozko specializiranim jamskim bakterijam. O predstavnikih *Nitrospira* so sicer poročali tudi iz Jame Tito Bustillo v Španiji (Schabereitner-Gurtner in sod., 2002a).

Predstavnike debla *Gemmatimonadetes* so opisali tudi v provinci Guizhou na Kitajskem (Zhou in sod., 2007), medtem ko o prisotnosti *Verrucomicrobia* in *Planctomycetales* v jamah doslej niso poročali.

6 SKLEPI

Z analizo 171 klonov šestih klonskih knjižnic bakterijskega gena za 16S rRNA mikrobnih prevlek Pajšarjeve Jame smo pokazali, da je mikrobnna raznolikost v vzorcu nepričakovano visoka. Z uporabljenou metodologijo nismo uspeli pokazati prisotnost arhej v našem vzorcu. Vloženi napor vzorčenja ni zadoščal, da bi v celoti zajeli raznolikost bakterij, saj bi dodatno vzorčenje pokazalo dodatno raznolikost. S tem smo ovrgli hipotezo, da je jamsko okolje za mikroorganizme skrajno okolje.

Pokazali smo, da mikrobne prevleke sestavljajo predstavniki osmih debel *Bacteria*, ki smo jih na osnovi 3-odstotne razlike v evolucijskih razdaljah razdelili v 50 operativnih taksonomskih enot (OTU). V vzorcu so prevladovali predstavniki *Proteobacteria*, *Actinobacteria* in *Nitrospira*. V tem pogledu je vrstna sestava mikrobnih prevlek nekoliko podobna sestavi prevlek, ki se v oligotrofnih jamah razvijejo v odgovor na antropogeni vnos hrani.

S filogenetsko analizo smo ugotovili, da so predstavniki posameznih OTU le malo sorodni doslej opisanim vrstam. Po drugi strani so bili predstavniki posameznih OTU pogosto sorodni zaporedjem gena za 16S rRNA, ki so jih osamili v podzemnih okoljih. Sklepali smo, da mikrobeno združbo, ki naseljuje stene Pajšarjeve Jame v veliki meri sestavljajo še neopisane bakterijske vrste, ki jih moramo osamiti v čisti kulturi.

7 VIRI

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.** 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- Aldrich J. R.** 1997. Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922. *Statistical Science*, 12:162-176.
- Angert E.R., Northup D.E., Reysenbach A.L., Peek A.S., Goebel B.M., Pace N.R.** 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*, 83: 1583-1592.
- Arhivirane vsebine.** 2009. Ljubljana, Društvo za raziskovanje jam Ljubljana: 1 str.
<http://www.dzrjl.si/content/arhivirane-vsebine> (maj 2010)
- Barton H.A., Spear J.R., Pace N.R.** 2001. Microbial life in the underworld: biogenicity of secondary mineral formation. *Geomicrobiology Journal*, 18: 359-368.
- Barton H.A., Jurad V.O.** 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Applied and Environmental Microbiology*, 23: 132-138.
- Bergsten J.** 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21: 163-193.
- Bastian F., Jurado V., Nováková A., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C.** 2009. The microbiology of Lascaux Cave Microbiology. *Journal of Molecular Biology*, 156: 644-652.
- Briee C., Moreira D., Lopez-Garci, P.** 2007. Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, 158: 213-227.
- Brosius J., Dull T.J., Sleeter D.D., Noller H.F.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 148: 107-127.
- Cañaveras J.C., Sanchez-Moral S., Soler V., Saiz-Jimenez C.** 2001. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiology Journal*, 18: 223-240.

Chelius M.K., Moore J.C. 2004. Molecular phylogenetic analysis of *Archaea* and *Bacteria* in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*, 21: 123-134.

Ciferri O. 1999. Microbial degradation of paintings. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 879-885.

Cole J.R., Chad B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., Schmidt T.M., Garrity G.M. 2003. The ribosomal databaseproject RDP-II previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31: 442-443.

Cuezva S., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C., Cañaveras J.C. 2009 Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira cave, Spain. *International Journal of Speleology*, 38: 83-92.

Cuezva S., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C., Canaveras J.C. 2009. Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira cave, Spain. *International Journal of Speleology*, 38: 83-92.

Culver D. C., Pipan T. 2009. The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford , Oxford University Press: 254 str.

DeLong E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5685-5689.

DeLong E.F. 1997. Marine microbial diversity-the tip of the icberg. *Trends in Biotechnology*, 15: 203-207.

Deming J.W. in Barros J.A. 1993. Deep-sea smokers windows to a subsurface biosphere. *Journal of the Geochemical Society and The Meteoritical Society*, 57: 3219-3230.

Dickson G.W, Kirk P. 1969. Distribution of heterotrophic microorganisms in relation to detritivores in Virginia caves. V: The distributional history of the biota of the southern Appalachians. Holt P.C., Paterson R.A. (eds.). Blacksburng, The University of Virginia Press: 205-226.

Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-97.

Edgell D.R., Fast N.M., Doolittle W.F. 1996. Selfish DNA: the best defence is a good offense. Current Biology, 6: 385-388.

Engel A.S., Lee N., Porter M.L., Stern L.A., Bennett P.C., Wagner M. 2003. Filamentous '*Epsilonproteobacteria*' dominate microbial mats from sulfidic cave springs. Applied and Environmental Microbiology, 69: 5503-5511.

Engel A.S., Porter M.L., Kinkle B.K., Kane T.C. 2001. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. Geomicrobiology Journal, 18: 259-274.

Ekataster jam. 2005. Ljubljana, Društvo za raziskovanje jam Ljubljana: 1 str.

<http://e-kataster.speleo.net/> (avgust 2010)

Felsenstein J. 2001. Taking variation of evolutionary rates between sites into account in inferring phylogenies. Journal of Molecular Evolution, 53: 447-455.

Fišar C. 2009. Sladkovodne postranice. Ljubljana, Prirodoslovno društvo Slovenije: 15 str

<http://www.proteus.si/files/file/RZK2009/postranice/robovi.html> (avgust 2010)

Fitch W. M., Margoliash E. 1967. The construction of phylogenetic trees-a generally applicable method utilizing estimator of the mutation distance obtained from cytochrome c sequences. Science, 55: 279-284.

Fox G. E., Pechman K. R., Wose C.R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. International Journal of Systematic Bacteriology, 27: 44-57.

Gams I. 2004. Kras v Sloveniji – v prostoru in času. Ljubljana, Založba ZRC: 293 str.

Ge Y., He J., Zhu Y., Zhang J., Xu Z., Zhang L., Zheng Y. 2008. Differences in soil bacterial diversity: driven by contemporary disturbances or historical contingencies? ISME Journal, 2: 254-264.

Gonzalez I., Laiz L., Hermosin B., Guerrero B., Incerti C., Saiz-Jimenez C. 1999. Microbial communities of the rock paintings of Altanterra shelter (south Spain). Journal of Microbiological Methods, 36: 123-127.

- Gonzales** J.M., Portillo M.C., Saiz-Jimenez C. 2006. Metabolically active *Crenarchaeaota* in Altamira cave. *Naturwissenschaften*, 93: 42-45.
- Groth** I., Vettermann R., Schuetze B., Schumann P., Saiz-Jimenez C. 1999. Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods*, 36: 115-122.
- Groth** I., Schumann P., Laiz L., Sanchez-Moral S., Cañaveras J.C., Saiz-Jimenez C. 2001. Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal*, 18: 241-258.
- Groth** I., Saiz-Jimenez C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*, 16: 1-8.
- Guindon** S., Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate phylogenies by ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240.
- Hartwig** G. 1871. The subterranean world. London, Longmans and Green: str. 163.
http://en.wikipedia.org/wiki/Leptodirus_hochenwartii (avgust 2010)
- Holmes** A.J., Tujula N.A., Holley M., Contos A., James J.M., Rogers P., Gillings M.R. 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*, 3: 256-264.
- Huber** T.G., Faulkner G., Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20: 2317-2319.
- Huelsenbeck** J.P., Ronquist F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Hüpop** K. 2000. How do cave animals cope with the food scarcity in caves? V: Ecosystems of the world: subterranean ecosystems. Culver D.C. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 159-188.
- Ikner** L.A., Toomey R.S., Nolan G., Neilson J.W., Pryor B.M., Maier R.M. 2006. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microbial Ecology*, 53: 30-42.

ISO 10523. Water quality -Determination of pH. 1994: 10 str.

Jones B. 2001. Microbial activity in caves – a geological perspective. Geomicrobiology Journal, 18: 345-357.

Jurado V, Porca E, Cuevva S, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. 2010. Fungal outbreak in a show cave. Science of the Total Environment, 408: 3632-3638.

Karaman S. 1972. Beitrag zur kenntnis der Oligochaetenfauna Jugoslawiens. Biološki vestnik: glasilo slovenskih biologov, 20, 1: 95-105.

Kovač P. 1971. Izolati heterotrofnih bakterij z organskih prevlek na stenah Planinske jame. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Biološki oddelek: 30 str.

Laiz L., Groth I., Gonzalez I., Saiz-Jimenez C. 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). Journal of Microbiological Methods, 36: 129-138.

Laiz L., Groth I., Schumann P., Zizza F., Felske A., Hermosin B. in Saiz-Jimenez C. 2000. Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. International Microbiology, 3: 25-30.

Laiz L., Gonzales J.M. in Saiz-Jimenez C. 2003. Microbial communities in caves: Ecology, physiology and effects on paleolithic paintings. V: Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art. Koestler R.J., Koestler V.R., Carola A.E., Nieto-Fernandez F.E. (eds.). New York, The Metropolitan Museum of Art: 210-225.

Larget B., Simon D.L. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 16: 750-759.

LTER-Slovenija. 2004. LTER - Long Term Ecological Research network: Project overview. Ljubljana, Scientific Research Centre of the Slovenian Academy of Sciences and Arts (SAZU): 1 str.

http://lter.zrc-sazu.si/project_overview.htm (september 2010)

Ludwig W., Strunk O., Klugbauer S., Weizenegger M., Neumaier J., Bachletiner M., Schleifer K. H. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis, 19: 554-568.

- Macalady J.L.**, Lyon E.H., Koffman B., Albertson, L.K., Meyer K., Galdezi S., Mariani S. 2006. Dominant microbial population in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 10: 5596-5609.
- Macalady J.L.**, Jones D.S . Lyon E.H. 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*, 9: 1402-1414.
- Megušar F.**, Sket B. 1973 On the nature of some organic covers on the cave walls. V: Proceedings of the 6th International Congress of Speleology. Olomouc, International Union of Speleology. Panoš V. (ed.). Praha, Academia, 5: 159-161.
- Meisinger D.B.**, Zimmermann J., Ludwig W., Schleifer K.H., Wanner G., Schmid M., Bennet P.C., Engel A.S., Lee N.M. 2007. In situ detection of novel *Acidobacteria* in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental Microbiology*, 9: 1523-1534.
- Merlak D.** 1975. *Proactinomyces spelaeophilus* v Planinski jami. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Biološki oddelek: 57 str.
- Mulec J.**, Zalar P., Zupan N., Rupnik M. 2002. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). *Acta carsologica = krasoslovni zbornik*, 31: 177-187.
- Mulec J.** 2005. Alge v kraških jamah Slovenije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 149 str.
- Mulec J.**, Kosi G. 2008. Algae in the aerophytic habitat of Račiške ponikve cave (Slovenia). *Natura Sloveniae: revija za terensko biologijo*, 10: 39-49.
- Mulec J.**, Walochnik J. 2007 Amoebe in carbonate precipitating microenvironments in karst caves. *Geophysical Research Abstracts*, 9: 1 str.
- Notredame C.**, Higgins D., Heringa J. 2000. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology*, 302: 205-217.
- Northup D.E.**, Lavoie K.H. 2001. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*, 18: 199-220.
- Northup D.E.**, Barns S.M., Yu L.E. 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environmental Microbiology*, 5: 1071-1086.

- Nübel** U., Engelen, B., Felske A., Snaidre J., Weishuber A., Amann, R. I., 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: 5636-5643.
- Palleroni** N.J. 1992. Introduction to the family *Pseudomonadaceae*. V: The *Prokaryotes*. Balows A., Trueper H.G., Dworkin M., Harder W., Schliefer K.H. (eds.). New York, Springer Verlag: 3071-3103.
- Pašić** L., Poklar U.N., Črnigoj M., Grabnar M., Herzog Velikonja B. 2005. Haloarchaeal communitis in the crystallizers of two adriatic solar salterns. Canadian Journal of Microbiology, 53: 8-18.
- Pearson** W.R. 1990. Rapid and sensitive sequence comparison with FASP and FASTA. Methods in Enzymology, 183: 63-98.
- Pohlman** J.W., Iliffe T.M., Cifuentes L.A. 1997. A stable isotope study of organic cycling and the ecology of an anchialine cave ecosystem. Marine Ecology Progress Series, 155: 17-27.
- Portillo** A., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M., Alonso A., Martinez J.L., Torres C. 2000. Macrolide Resistance genes in *Enterococcus* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy: 44, 4: 967-971.
- Portillo** M.C., Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and gray colonizations on the walls of Altamira cave, Spain. Journal of Applied Microbiolog, 104: 681-691.
- Portillo** M.C., Saiz-Jimenez C. in Gonzalez J.M. 2009. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of 'white colonization' in the Altamira Cave, Spain. Research in Microbiology, 160: 41-47.
- Promega Corporation**. 2009: Technical manual no. 042. Madison, Promega Corporation.
(navodila za uporabo)
- <http://www.tcd.ie/Genetics/staff/Noel.Murphy/recombinant%20dna%20ge4021/pgem.pdf>
(avgust 2010): 28 str.

- Rainey** F. A., Ward-Rainey N. L., Janssen, P. H., Hippe H., Staeekebrands E. 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology*, 142: 2087-2095.
- Rannala** B., Yang Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43: 304-311.
- Rossello-Mora** R., Amman, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology*, 25: 39-67.
- Rodríguez-Valera** F. 2002. Approaches to prokaryotic diversity: a population genetics perspective. *Environmental Microbiology*, 4: 628-633
- Ruffo** S., Vonk R. 2000. *Ingolfiella beatricis*, new species (amphipoda: ingolfiellidae) from subterranean waters of Slovenia. *Journal of Crustacean Biology*, 21:484-491.
- Saitou** N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sanger** F., Nicklen S., Coulson A. R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467.
- Sarbu** S.M. 2000. Movile Cave: a chemoautotrophically based groundwater ecosystem. V: Subterranean Ecosystems. Wilkins H., Culver D.C., Humphreys W.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 319-343.
- Schabereiter-Gurtner** C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2002a. Altamira cave Paleolithic paintings harbour partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiol Letters*, 211: 7-11.
- Schabereiter-Gurtner** C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2002b. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology*, 4: 392-400.
- Schabereiter-Gurtner** C., Saiz-Jimenez C., Piñar G., Lubitz W. in Rölleke S. 2004. Phylogenetic diversity of bacteria associated with palaeolithic paintings and surrounding

rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma). FEMS Microbiol Letters, 47: 235-247.

Schloss P.D., Handelsman J. 2005. Introducing species richness DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating. Applied and Environmental Microbiology, 71: 1501-1506.

Sket B. 2008. Can we agree on an ecological classification of subterranean animals? Journal of Natural History, 42:21, 1549-1563.

Staley J.T., Konopka A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Review of Microbiology, 39:321-46.

Stevens A.H. 1997. Persistent effects of job displacement: The importance of multiple job loss. Journal of Labor Economics, 15: 165-188.

Tkavc R. 2007. Identifikacija in genotipizacija entomopatogenih gliv izoliranih iz troglofilnih metuljev *Scolipteryx libatrix* L. in *Triphosa dubitata* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 80 str.

Wen-Hsiung L., Graur D. 1991. Fundamentals of molecular evolution. Sunderland, Sinauer Associates: 284 str.

Woese C., Kandler O., Wheelis M. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87: 4576-4579.

Zagmajster M. 2009. Navdihujoča raznolikost življenja v podzemlju. Ljubljana, Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije: 7 str
http://www.mvzt.gov.si/si/znanje/zanje_zanje/dr_maja_zagmajster_navdihujoca_raznolikost_zivljenja_v_podzemlju/ (september. 2010)

Zimmermann J., Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C. 2005. Epilithic biofilms in Saint Callixtus Catacombs (Rome) harbour a broad spectrum of *Acidobacteria*. Antonie van Leeuwenhoek, 89: 203-208.

Zhou J., Gu Y., Zou C. in Mo M. 2007. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China. *Journal of Microbiology*, 45: 105-112.

Zuckerkandl E., Pauling, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8: 357-366.

Zupan Hajna N. 2010. Kras. Ljubljana, Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti: 1 str.

<http://www.razvojkrasa.si/si/relief/142/article.html> (september 2010)

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorici doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja ter somentorici in hkrati tudi delovni mentorici dr. Lejli Pašić za vso nesebično pomoč in podporo pri opravljanju diplomskega dela na katedri za molekularno genetiko. Hvala, da sta mi bili vedno na voljo in pripravljeni pomagati.

Posebna zahvala gre tudi prof. dr. Boris Sketu, ki je predlagal temo za diplomsko delo in me navdušil za raziskovanje jamskega srebra in dr. Maji Zagmajster, ki nas je popeljala v Pajšarjevo jamo in poskrbela za vso varnost in opremo v jami.

Hvala tudi prof. dr. Davidu Stoparju za hitro in temeljito popravilo mojega diplomskega dela.

Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko, Oddelka za biologijo, ki so mi z nasveti in tudi drugače pomagali pri izvedbi diplomskega dela.

Vsa zahvala gre tudi moji družini, ki mi je bila vsa leta študija v trdno oporo in me spodbujala na vseh študijskih korakih.

Hvala tudi sošolcem in sostanovalkam, ki so poskrbeli, da so bila študijska leta prijetna in nepozabna.

In nazadnje posebna zahvala gre tudi mojemu zaročencu Toniju Ramšaku, ki mi je stal ob strani prav vsak trenutek in me na moji poti podpiral in spodbujal.

Hvala vsem!