

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nadja ROBIČ

**ANALIZA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE IN
SEDIMENTOV ŠTIRIH NEPOVEZANIH JAMSKIH
SISTEMOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nadja ROBIČ

**ANALIZA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE IN SEDIMENTOV ŠTIRIH
NEPOVEZANIH JAMSKIH SISTEMOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERISTICS OF MICROBIAL COMMUNITIES IN
SEDIMENT DEPOSITS SAMPLED FROM FOUR DIFFERENT CAVE
SYSTEMS IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti. Delo na terenu smo opravili s pomočjo članov Jamarskega kluba Železničar, Ljubljana, Jamarskega društva Logatec in dr. Janeza Mulca, Inštitut za raziskovanje krasa, ZRC SAZU. Raziskave so potekale v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobnio biotehnologijo Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorja je bil imenovan doc. dr. Blaž Stres, za somentorja dr. Janez Mulec in za recenzentko doc. dr. Polona Zalar.

Člani komisije za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Ines Mandič-Mulec Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	doc. dr. Blaž Stres Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	dr. Janez Mulec Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Postojna
Članica:	doc. dr. Polona Zalar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

S podpisom jamčim, da je diplomska naloga rezultat lastnega dela.

Nadja Robič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.26:551.435.84:577.2.08(043)=163.6
KG	jamska mikrobiologija/mikrobne združbe/fizikalno kemijske lastnosti okolja/ekstrakcija hranil iz tal/tipizacija mikrobnih združb/TRFLP/LH PCR
AV	ROBIČ, Nadja
SA	STRES, Blaž (mentor)/MULEC, Janez (somentor)/ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	ANALIZA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE IN SEDIMENTOV ŠTIRIH NEPOVEZANIH JAMSKIH SISTEMOV
TD	Diplomsko delo
OP	XIV, 88 str., 8 pregl., 20 sl., 1 pril. 75 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Mikrobne združbe v podzemnih habitatih in pogoji, s katerimi razpolagajo, so dokaj neraziskano področje jamske mikrobiologije, ki je šele nedavno postala del speleoloških raziskav. Slovenija ima s 43 % kraškega površja in z več kot 10419 registriranimi jamami odlične pogoje za tovrstne analize, občutljivost te pokrajine na človeške aktivnosti pa hkrati zahteva dobro poznavanje le teh za vzpostavitev kontrole. Naša raziskava temelji na splošnem vpogledu v raznolikost dejavnikov okolja in na strukturo mikrobnih združb med različnimi jamami ter v primerjavi s površinskimi tlemi. V ta namen smo odvzeli skupno devet vzorcev klastičnih sedimentov iz štirih jam. Izvedli smo osnovne fizikalno-kemijske analize in del rezultatov uporabili za dopolnitev zbirke podatkov z vzorci tal ter s programom PAST preverili razpršenost vzorcev. Za izvedbo molekularnih analiz smo, z inkubacijo vzorcev sedimenta s talnim ekstraktom, uprizorili naravni vnos hranil in združb v jame. S tehnikama TRFLP in LH PCR smo analizirali strukturo mikrobne združbe pred in po dodatku ekstrakta. Po naših rezultatih se vzorci sedimenta niso razlikovali v okoljskih dejavnikih ali po strukturi mikrobne združbe glede na vzorčeno jamo. Po zajetih parametrih analize PAST prav tako ni bilo opaznih razlik v primerjavi okoljske komponente z vzorci tal, medtem ko se je struktura mikrobne združbe iz jam povsem razlikovala od združbe v tleh, kar je bilo opazno tudi po končani inkubaciji. Molekularni signal talnega ekstrakta se je vmešal med vzorce sedimenta, medtem ko je vzorec tal, iz katerega smo ekstrakt pripravili, ostal v ločeni skupini na dendrogramu pri obeh tehnikah tipizacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.26:551.435.84:577.2.08(043)=163.6
CX	cave microbiology/microbial communities/physical and chemical parameters/soil nutrient extraction/microbial community typization/TRFLP/LH PCR
AV	ROBIČ, Nadja
AA	STRES, Blaž (supervisor)/MULEC Janez (co-advisor)/ZALAR, Polona (reviewer)
PP	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Program in Microbiology
BY	2012
TY	CHARACTERISTICS OF MICROBIAL COMMUNITIES IN SEDIMENT DEPOSITS SAMPLED FROM FOUR DIFFERENT CAVE SYSTEMS IN SLOVENIA
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XIV, 88 p., 8 tab., 20 fig., 1 ann., 75 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Cave microbiology, recently acknowledged as an integral part of speleology, has yet to determine the structure of microbial communities and its relation to the subsurface environment. Given the 43 % of total karst surfaces and 10419 caves registered to date, Slovenia has the ideal settings as well as the responsibility to invest in research of this delicate region in order to preserve it in good health. The purpose of this study was to assess the difference in microbiological and environmental properties of clastic sediments between four sampled caves and in comparison to the surface soil. We analysed the basic chemical and physical characteristics of cave sediments, added a small set of parameters to a data collection of 72 soil samples and determined the level of uniqueness of subsurface habitat by using the program PAST. By conducting an incubation experiment on cave sediments using soil exudate, we imitated the natural inflow of nutrients and organisms underground. Our molecular studies were based upon typization of microbial structure prior to and after adding the soil extract to cave samples, using techniques TRFLP and LH PCR. According to our data the sediments show no differences in habitat properties or in the structure of microbial communities regarding to the cave of their origin. Comparing the environmental parameters to soil samples, the difference remained inconsequential, while the structure of bacterial population in sediments showed little or no similarity to the structure of such community in the soil sample even after being incubated with the soil extract. The genetic signal obtained from the soil exudate was clustered together with cave sediment samples on the similarity tree, while the soil sample remained on a separate branch.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XIV

1	UVOD	1
1.1	NAMEN	1
1.2	CILJI IN HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	KRAŠKI POJAVI	3
2.2	KRAŠKE JAME	4
2.2.1	Korozija	5
2.2.2	Afotičnost in njen vpliv na biotop	7
2.2.3	Okoljski parametri	8
2.2.4	Energetski spleti	9
2.3	JAMSKI SEDIMENTI	9
2.4	ŠTUDIJE MIKROORGANIZMOV V JAMAH	12
2.4.1	Mikrobna raznolikost in porazdelitev v jamah	12
2.4.2	Pregled študij jamske mikrobiologije	14
3	MATERIALI IN METODE DE LA	19
3.1	SEZNAM UPORABLJENEGA MATERIALA	19
3.1.1	Reagenti, pufri in encimi	19
3.1.2	Laboratorijska oprema	20
3.2	PRIDOBIVANJE DOVOLJENJ	22
3.3	SHEMA DE LA	23

3.4	VZORČENJE	24
3.4.1	Križna jama	26
3.4.2	Novo odkrita jama Rimljanka	27
3.4.3	Velika ledenica v Paradani	28
3.4.4	Postojnska jama	30
3.5	ANALIZE FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH DEJAVNIKOV OKOLJA	33
3.5.1	Aktivna in potencialna kislost (pH)	33
3.5.2	Vlažnost	33
3.5.3	Zmožnost zadrževanja vode	34
3.5.4	Vsebnost organske snovi in organskega ogljika	35
3.5.5	Indeks molekulske mase raztopljenе organske snovi	36
3.5.6	Določanje teksturnih razredov jamskih sedimentov s sedimentacijsko metodo	37
3.5.7	Določanje poroznosti vzorcev sedimenta	38
3.5.8	Primerjava fizikalno – kemijskih parametrov jamskih sedimentov s podatki vzorcev tal	39
3.6	MOLEKULARNE ANALIZE JAMSKIH SEDIMENTOV	40
3.6.1	Izolacija DNA	40
3.6.2	Pomnoževanje odsekov gena DNA, ki kodira 16S rRNA, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	40
3.6.3	Gelska elektroforeza	41
3.6.4	Redčenje izolirane DNA	42
3.7	SIMULACIJA SPOMLADANSKEGA VNOSA HRANIL - INKUBACIJA VZORCEV JAMSKIH SEDIMENTOV Z EKSTRAKTOM HRANIL IZ TAL.....	42
3.7.1	Priprava ekstrakta	43
3.7.2	Inkubacija vzorcev	43
3.7.3	Odstranjevanje ekstrakta in priprava za molekularne analize	44
3.7.4	Fizikalno kemijske analize ekstrakta	44
3.8	TIPIZACIJA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V JAMSKIH SEDIMENTIH.....	44

3.8.1	Bioinformatična analiza potencialnih fragmentov tehnik LH PCR in TRFLP z izbranimi začetnimi oligonukleotidi in restrikcijskimi encimi.....	45
3.8.2	Priprava vzorcev za tipizacijo bakterijskih združb z metodama LH PCR in TRFLP.....	46
3.8.3	Analiza raznolikosti v dolžini pomnoženega gena za 16S rRNA (LH PCR)	46
3.8.4	Analiza polimorfizma dolžin končnih fragmentov restrikcije gena za 16S rRNA (TRFLP)	47
3.8.5	Analiza rezultatov tipizacijskih tehnik LH PCR in TRFLP	48
4	REZULTATI	49
4.1	ANALIZE DEJAVNIKOV OKOLJA	49
4.1.1	Kislost vzorcev – pH.....	50
4.1.2	Voda v vzorcih.....	52
4.1.3	Indeks molekulske mase raztopljenih organskih snovi.....	53
4.1.4	Meritve organskega ogljika	55
4.1.5	Tekstura.....	57
4.1.6	Poroznost vzorcev sedimenta.....	59
4.1.7	Primerjava lastnosti jamskih sedimentov z vzorci površinskih tal.....	61
4.2	MOLEKULARNE ANALIZE BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V JAMSKIH SEDIMENTIH	62
4.2.1	Izolacija DNA iz vzorcev jamskega sedimenta pred inkubacijo s talnim ekstraktom	62
4.2.2	Redčenje DNA iz vzorcev jamskega sedimenta	63
4.2.3	Rezultati bioinformatične analize	64
4.2.4	Analiza bakterijskih združb jamskih sedimentov v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom, s tehnikama LH PCR in TRFLP.....	67
4.2.5	Analiza bakterijskih združb jamskih sedimentov začetnega in končnega stanja inkubacije s talnim ekstraktom, s tehnikama LH PCR in TRFLP.....	69

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	73
5.1	RAZPRAVA	73
5.1.1	Analize okoljskih dejavnikov	73
5.1.2	Molekularne analize	75
5.2	SKLEPI	77
6	POVZETEK	78
7	VIRI	80
	ZAHVALE	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Hidrografska conalnost na krasu (Ravbar, 2007)	7
Slika 2: Shematski prikaz eksperimentalnega postopka.	23
Slika 3: Označene lokacije vseh vzorčenj v raziskovalni nalogi in referenčnih vzorcev (Google earth, 2012).	25
Slika 4: Načrt Križne jame in Medvedjega rova, z označenimi mesti vzorčenja (Bosák in sod., 2010: 533).	26
Slika 5: Neuradna skica jame Rimljanka z označenim mestom vzorčenja (Jeraj, 2012).	27
Slika 6: Načrt Velike ledenice v Paradani z označenimi mesti vzorčenja (JD Logatec, 2002).	29
Slika 7: Sistem Postojnske jame (Zupan Hajna in sod., 2010: 55) in profil Rova koalicije v Spodnjem Tartarusu s prikazanimi mesti vzorčenja v diplomskem delu Zakotnik (2011).	31
Slika 8 : Aktivne in potencialne vrednosti pH vzorca površinskih tal (Godicelj, 2011) in vzorcev jamskega sedimenta.	50
Slika 9: Masni odstotek vode (w %) na dan vzorčenja in sposobnosti zadrževanja vode (WHC %) v vzorcih jamskih sedimentov.	52
Slika 10: Raztopljena organska snov v vzorcih sedimenta in ekstrakta travniških tal (E1, E2), izražena z recipročno vrednostjo indeksa molekulske mase (1/IMM) glede na kvocient absorbance suspenzije vzorcev pri valovni dolžini 250 nm in 365 nm.	54
Slika 11: Vsebnosti organske suhe snovi (OSS) in skupnega organskega ogljika (TOC) v vzorcih jamskega sedimenta (A) in analiza anorganskega ogljika s kontrolnimi vzorci tal, sedimenta in kamnin (B).	56
Slika 12: Teksturne frakcije prikazane z grafom (A) in uvrščene v teksturnem trikotniku USDA klasifikacije (B) z razdelitvijo po Plaster-ju, 1992 (Zupan in sod., 1998).	58
Slika 13: Volumen por v vzorcih sedimenta. Za vzorec Po1 izvedba eksperimenta ni bila mogoča.	60
Slika 14: Razpršenost podatkov vzorcev tal in jamskega sedimenta glede na	

okoljske parametre, prikazana s programom PAST (Hammer in sod., 2001).	61
Slika 15: Gelska elektroforeza produktov reakcije PCR, s 27f-926R parom začetnih oligonukleotidov, za nerazredčeno DNA vzorcev v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom.	63
Slika 16: Gelska elektroforeza produktov reakcije PCR, s 27f-518R parom začetnih oligonukleotidov ter razredčeno DNA, izolirano iz vzorcev jamskih sedimentov v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom.....	64
Slika 17: Analiza dolžinske raznolikosti s programom BEstRF (Stres in sod., 2009), za para začetnih oligonukleotidov 27f-518R in 27f-926R na podlagi nabora 166.945 okoljskih sekvenc gena za 16S rRNA iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009).	65
Slika 18: <i>In silico</i> analiza restrikcijskih fragmentov s programom BEstRF (Stres in sod., 2009) za tri različne encime in dva para začetnih oligonukleotidov, na naboru 166.945 sekvenc gena za 16S rRNA okoljskih študij iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009).....	66
Slika 19: Dendrograma profilov tipizacije bakterijske združbe v vzorcih jamskih sedimentov in vzorcu tal pred inkubacijo s talnim ekstraktom.....	68
Slika 20: Dendrograma profilov vzorcev začetnega in končnega stanja inkubacije s talnim ekstraktom, z LH PCR metodo (A) in TRFLP metodo (B).....	71

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovni podatki o vzorčenih jamah.....	24
Preglednica 2: Podatki o vzorcih jamskih sedimentov	32
Preglednica 3: Protokol pomnoževanja gena za 16S rRNA z reakcijo PCR	41
Preglednica 4: Fizikalni in kemijski parametri za vzorce jamskih sedimentov.	49
Preglednica 5: Izračun razlike v koncentraciji vodikovih protonov med aktivno in potencialno vrednostjo pH po enačbi (2), za vzorce jamskih sedimentov in za podatke vzorca površinskih tal (Godicelj, 2011).....	51
Preglednica 6: Teksturne frakcije vzorcev in tip sedimenta določen po USDA klasifikacijskem sistemu.....	57
Preglednica 7: Fizikalno-kemijski parametri analiz vzorca tal in ekstrakta hranil iz tal, po protokolih Sabine Kolbl (Doktorska disertacija v pripravi, FGg).	69
Preglednica 8: Izmerjena relativna koncentracija DNA vzorcev, določena s programom Genetools (Syngene, VB) [ng] glede na izbrani standard 1 kbp lestvice (pri 1000 bp v 1 µl lestvice = 12 ng DNA) na sliki gela elektroforeze PCR pomnožkov.....	70

KAZALO PRILOG

Priloga A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNA	ribonukleinska kislina, strukturna komponenta male podenote bakterijskega ribosoma za sintezo peptidov
A	absorbanca, mera za optično gostoto (OD) snovi, negativni logaritem prepustnosti svetlobe specifične valovne dolžine
bp	bazni pari v dvoverižni vijačnici nukleinske kisline
CE	Centralno-evropski tip tal
DNA	deoksiribonukleinska kislina
IZRK ZRC SAZU	Inštitut za raziskovanje krasa Znanstvenoraziskovalni center Slovenske akademije znanosti in umetnosti
JD	jamarsko društvo
JZS	Jamarska zveza Slovenije
kb	kilobazni pari, 1000 baznih parov v dvoverižni vijačnici DNA
p.n.	inkubacija preko noči pri navedenih pogojih
TOC	celokupni organski ogljik (angl.: <i>Total Organic Carbon</i>)
TRF	terminalni restrikcijski fragment, končni segmenti encimsko razrezane nukleinske kisline, označeni s fluorescirajočim barvilom, navadno na 5' koncu

SLOVARČEK

Hidrografska conalnost	delitev globinskega profila na krasu v cone, glede na zadrževanje in tok vode v podzemlje. Od zgoraj navzdol jo sestavljajo neprežeta (tudi vadozna ali aeracijska) cona, ki se deli na epikras na površju in kamninski sloj pod njim. Sledi območje nihanja vodne gladine v občasno prežeti ali epifreatični coni ter stalno zaliti kanali v prežeti, freatični coni.
Klastični jamski sediment	ves sedimentni material v jami, ki ni nastal s kemičnimi procesi. To so netopni delci, ki se z prenašajo z mehanskim prenosom preko vode ali vetra. Lahko so alohtoni - vneseni v jame iz njene okolice ali avtohtoni, ki so najpogostejše posledica krušenja v jami.
Siga	izločanje, precipitacija kalcita iz korozijske vode (sigovice) zaradi razlike v parcialnem tlaku CO ₂ v jami. Z odlaganjem sige nastanejo jamske strukture (kapniki, ponvice, kope, itd.).
Speleologija	jamoslovje, veda o jamah.

1 UVOD

1.1 NAMEN

Jamska mikrobiologija je šele pred kratkim postala integralni del speleoloških raziskav, zato ni presenetljivo, da so sedimentni skladi v podzemlju s stališča mikrobiologije še neraziskan ekosistem pri nas in po svetu. Zaradi stabilnosti okolja v katerem se skladiščijo, vsebujejo številne informacije o preteklih klimatskih, hidroloških, geoloških razmerah. Postali so pomembno orodje za datacijo vnosa materiala v jamo, ki poda oceno njene starosti in za analizo poteka speleogeneze, medtem ko je o biotski komponenti znanega zelo malo. Prednost sedimenta je v dolgotrajnem skladiščenju v jami, kjer ni izpostavljen klimatskem nihanju, padavinam in UV sevanju, ki pospešujejo preperevanje materiala. Posledično se ohrani večina lastnosti iz geološke dobe v kateri se je material prenesel v jamo ali tam nastal (Mulec, 2012). Skupaj z delci sedimenta je v podzemlje zaneslo tudi mikrobno biomaso, ki prav tako lahko vsebuje pomembne informacije o samem sedimentu, o okolju iz katerega izhaja in o razvoju prilagoditvenih mehanizmov mikrobne združbe na drastično spremembo habitata. Slednja lastnost omogoča veliko verjetnost odkritja metabolnih encimov in sekundarnih produktov, ki so biotehnološko perspektivni (Barton in sod., 2010).

Večina dosedanjih mikrobioloških analiz podzemnih okolij se je osredotočila na jamske strukture z opazno mikrobno aktivnostjo ter na analizo vodnih teles. Prav tako je večina raziskav potekala v lahko dostopnih, turističnih jamah ali v jamah nastalih s korozijo žveplene kisline, kjer so nastali specifični prehrambni spleti. Predpostavili smo, da je sediment v težje dostopnih, ne turističnih jamah in izven današnjega neposrednega dosega jamskega rečnega sistema ali pronicanja vode, bolj ohranjen. V takšnem okolju posledično obstaja večja verjetnost za obstoj mikrobnih združb, ki so se dolgoročno prilagodile na oligotrofno okolje. Prav tako smo predpostavili, da se je prisotna združba znašla v jami v približno enakem obdobju kot sedimentni material, iz katerega smo jo izolirali.

1.2 CILJI IN HIPOTEZE

Vzorci smo odvzeli iz klastičnih sedimentnih nanosov štirih jamskih sistemov z Dinarskega krasa. Vse vzorčene jame se med seboj razlikujejo po nastanku, tipu in obliki, vodni aktivnosti, obiskanosti, fizikalnih in kemijskih pogojih. Za ovrednotenje hipotez smo rezultate primerjali z analizo površinskih tal izpod travniške vegetacije. Zanimala nas je stopnja raznolikosti med različnimi jamskimi sistemi in v kolikšni meri se razlikujejo v fizikalno-kemijskih dejavnikih in biotski komponenti od navadnih travnatih tal.

Postavili smo štiri ničelne hipoteze [H_0] sledeče raziskave:

- Pričakujemo, da se v klimatsko podobnih pogojih odlaganja sedimentov v jamah, fizikalne in kemijske lastnosti mikrookolja bistveno ne razlikujejo.
- Fizikalne in kemijske lastnosti jamskih sedimentov se ne razlikujejo od lastnosti površinskih tal.
- Struktura mikrobne združbe jamskih sedimentov ni drugačna od strukture mikrobne združbe v površinskih tleh, od koder izvirajo.
- Dodatek ekstrakta tal v inkubacijskem eksperimentu ne bo vplival na strukturo mikrobne bakterijske združbe v vzorcih jamskega sedimenta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRAŠKI POJAVI

Zaradi nenavadnega reliefa in hidroloških pojavov, ki jih opisuje že antična literatura (Clendenon, 2009), so kraške pokrajine v času Avstro Ogrske vladavine postale predmet natančnih raziskav. Najbolj intenzivno so se odvijale na Krasu, planoti, ki leži med Tržaškim zalivom, Divačo in Vipavsko dolino. Ker sta kamniti teren in suša na tem območju zelo izrazita, je oznaka "kraški svet" iz pridevniške rabe sčasoma prešla v obče ime te pokrajine. V izogib zmešnjavi jo stroka imenuje Matični kras, ki predstavlja del Klasičnega krasa Dinarskega hribovja, po katerem so postavili kriterije za naziv kraške pokrajine po svetu (Gams, 2004).

Prvo znanstveno monografijo krasoslovja z naslovom *Das Karstphänomen*, je konec 19. st. objavil Srb Jovan Cvijić, kot doktorsko disertacijo študija na Dunaju (Waele in sod., 2009). S povezavo in razlago različnih kraških pojavov ter uvedbo novih definicij, je nakazal celovito kompleksnost tovrstnih pokrajin ter sprožil raziskave tudi drugod v tujini. V stroko je poleg utrditve izraza kras (v tuji literaturi: *karst*), uvedel mnogo drugih slovenskih izrazov (dolina, polje, fojba, itd.) (Gams, 2004).

Po današnji definiciji so kraške pokrajine površja, kjer ima vodna korozija večji vpliv na njihovo strukturiranost kot erozija (Culver in Pipan, 2009). To so območja z edinstveno geomorfologijo in kompleksnimi vodnimi tokovi, ki se pretakajo predvsem v podzemlju. Glede na tip matične kamnine delimo kras v različne petrografske razrede, najbolj značilen pa je karbonatni kras, ki prevladuje na naših tleh. Kraški pojavi nastajajo na dobro topnih kamninah apnenca in na malo manj topnem, vendar bolj drobljivem dolomitu. Glavno vlogo pri zakrasevanju ima voda, ki z raztapljanjem (korozija) in prenosom (denudacija) snovi kemično in mehansko izoblikuje geološko podlago, netopni ostanki pa so osnova za nastanek klastičnih sedimentov.

Čistost matične kamnine, tj. odstotek kalcita in dolomita, ki na območju Dinarskega krasa lahko presega 95 %, zaloga vode in meteorološki pogoji v največji meri določajo stopnjo zakrasevanja, ki poteka še danes (Gams, 2004).

V Sloveniji imamo nadpovprečnih 43 % zelo čistih karbonatnih kamnin, od tega 35 % apnenca in 8 % dolomita. Takšna geološka sestava je posledica plitvomorske ploščadi, ki je v mezozoiku pokrivala širok pas od današnje Italije preko Slovenije do Črne Gore. V dobi dolgi 200 milijonov let so bili pogoji za odlaganje karbonatov zelo ustrezni in danes ti skladi ponekod segajo tudi več kilometrov globoko. Ploščo imenujemo Dinarska ali Jadranska karbonatna platforma, ki je po umiku morja zakrasela. Zaradi preloma v ploščadi, se je pri nas območje ločilo na severni Alpski in južni Dinarski del krasa, ki sega čez ves Balkan (Herlec in Hlad, 2005).

Skoraj polovico naše države, okoli 43 % torej tvori zelo porozen kraški svet, ki predstavlja vir pitne vode za več kot polovico prebivalcev. Zaradi visoke občutljivosti na kakršnokoli človeško aktivnost takšna področja zahtevajo natančne študije in redno nadzorovanje. Mikroorganizmi so zelo dober pokazatelj stanja okolja. Z analizo indikatorskih vrst lahko določimo ustreznost ali oporečnost vode, posledice onesnaževanja in vir onesnaženja (Mulec, 2012). Inštitut za raziskovanje krasa Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti (IZRK ZRC SAZU) je prevzel ključno vlogo pri izvajanju raziskav, vodenju sistema nadzora in seznanjanju ljudi z lastnostmi kraških pokrajin (Gabrovšek in sod., 2011).

2.2 KRAŠKE JAME

Po podatkih katastra Jamarske zveze Slovenije (JZS) in IZRK ZRC SAZU je do leta 2012 pri nas registriranih že 10419 jam (JZS, 2012). Vsako leto se število poveča za okoli 100 novih. K temu pripomorejo predvsem jamarska društva in organiziranost katastra. Aktivni jamarji preko enotnega obrazca opišejo glavne lastnosti, lokacijo in načrt na novo odkrite jame. Po pridobitvi zaporedne katastrske številke se vsi podatki o tej jami, skupaj z vsemi naknadno dodanimi zapisniki raznovrstnih akcij, hranijo na sedežu katastra, ki predstavlja

edinstven vir informacij. Prvi zapisi o jamah segajo že v 17. st., medtem ko se organizirana evidenca podatkov vodi od ustanovitve prvega jamarskega društva leta 1910. Sredi 20. st. je vodenje katastra poleg JZS vzelo pod okrilje tudi IZRK SAZU (Gabrovšek in sod., 2011).

Danes registracija določene jame v kataster zahteva, da je le-ta naravna, človeku prehodna podzemeljska votlina, ki je daljša ali globlja od desetih metrov (Zakrajšek in sod., 2011). Z vidika speleoloških (jamskih) raziskav se definicija prilagodi določenemu področju. Podzemlje je širši pojem, označuje odprtine pod površjem, ki lahko segajo od milimetrskih razpok do kilometrskih rogov in so v teoriji večinoma še nedostopni človeku. Za jame pa štejemo človeku dostopne, naravno nastale podzemne sisteme, ki imajo območja popolne teme (Northup in Lavoie, 2001).

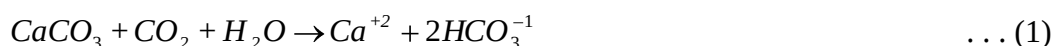
Naravni podzemni sistemi po svetu so tako raznoliki kot same pokrajine kjer so nastali. Poleg "pravega" krasa stroka še vedno ni enotna glede umestitve geomorfoloških posebnosti ledeniškega in vulkanskega delovanja, kjer jih prav tako zasledimo (Gams, 2004). Pojavljajo se na vsakem kontinentu z izjemo Antarktike in v skoraj vsaki državi. Nastajajo na kopnem in v morju, predvsem na karbonatih in evaporitih (gips, sadra, halit), redkeje v kvarcitu. Nastajajo z raztapljanjem kamnine, predvsem z ogljikovo ali žvepleno kislino, ali pa mehansko; v prelomu in s tektonski premiki. Vse to vpliva na razlike v njihovi obliki, lastnostih, biotopu, itd. (Culver in Pipan, 2009).

V tej diplomski nalogi smo se osredotočili na jame karbonatnega krasa, ki so najbolj zastopane pri nas. Če za definicijo privzamemo glavne karakteristike, ki opredelijo obravnavano problematiko, so kraške jame naravne podzemne in človeku prehodne odprtine v trdni kamnini, nastale s korozijsko topnih kamnin. Zanje je značilna odsotnost sončne svetlobe, relativno stabilni pogoji in da so večinoma revne s hranili.

2.2.1 Korozija

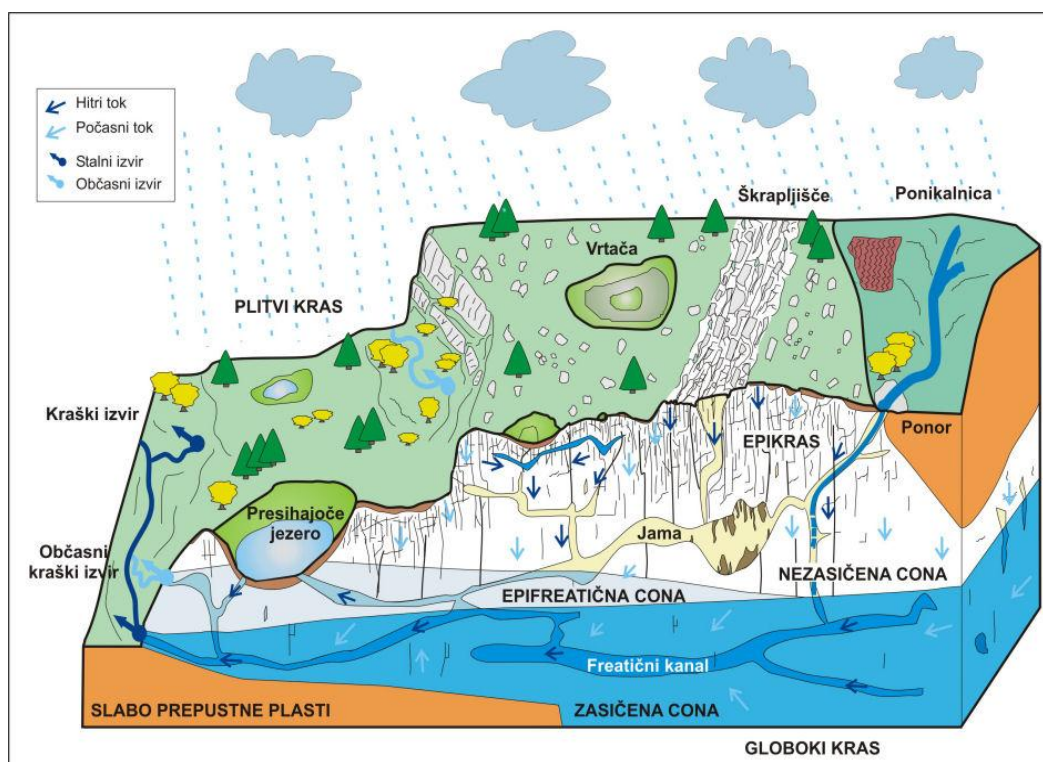
Kalcijev karbonat (CaCO_3) je gradnik kalcita, osnovnega minerala apnenca, pri dolomitu pa je del kalcijevih ionov zamenjal magnezij (dolomitizacija). V čisti vodi se kalcit slabo

topi, v kraških vodah pa je koncentracija CaCO_3 tudi do 20-krat višja. Glavni vzrok je zakisanje meteorne vode, predvsem z ogljikovim dioksidom ob prehodu skozi atmosfero in tla. Nastala ogljikova kislina v vodi razpade na bikarbonat in vodikov proton, ki napade karbonatno skupino kalcitnega ali dolomitnega minerala ter tvori bikarbonat. Prikaz celokupne reakcije korozijskega razpada kalcitnega minerala lahko prikažemo z enačbo (Gams, 2004):



Povišana koncentracija industrijskih plinov in posledično CO_2 v atmosferi pospešuje korozijo krasa (Gams, 2004). Kisla voda deževnice ima največjo korozijsko moč do prvih nekaj metrov pod površjem. Tvorijo kraške strukture, ki najpogosteje služijo njenemu pretoku v podzemlje (požiralniki, ponori, vrtače, doline, škraplje). Med talnim ponikanjem skozi epikras agresija raztapljanja upada z globino tal, hkrati pa se ponovno zakisa s CO_2 , ki je prisoten v tleh. Ob stiku s kamnino, ogljikova kislina ponovno reagira, širi špranje in razpoke, raztaplja karbonate ter tvori kanale navpičnega prenikanja, ki se razvijajo v kraške podzemeljske sisteme (Waele in sod., 2009).

Na kraškem svetu je pogosta suša, saj se večina vode nahaja globoko pod površjem v vodonosnikih, ki se napajajo z deževnico in pritoki vode z nepropustnih kamnin. Hidrografska conalnost opisuje način pretakanja vode skozi kras in razdeli globinski profil v pasove. Pod površjem krasa se nahaja neprežeta, imenovana tudi vadozna ali aeracijska cona, kjer se padavinska voda med talnim in navpičnim ponikanjem obogati hranili in mikroorganizmi. Sestavljata jo vrhnji epikraški sloj tal in spodaj ležeči kamninski sloj. Epifreatična cona je poplavno območje pod vadozno cono, ki je zaradi dviga vodne (piezometrične) gladine občasno zalito. Kanale, ki so popolnoma in ves čas napolnjeni z vodo imenujemo prežeta ali freatična cona. Ti lahko segajo mnogo globlje od nivoja podtalnice, vse dokler voda ne naleti na netopno kamnino. Jame se močno razlikujejo glede na cono v kateri nastanejo. V neprežeti coni so zaradi navpičnega prenikanja pretežno strme jame in brezna s kamini, v občasno zaliti coni pa so jame vodoravne (Gams, 2004).



Slika 1: Hidrografska conalnost na krasu (Ravbar, 2007)

2.2.2 Afotičnost in njen vpliv na biotop

Popolna tema (afotičnost) v globljih predelih jam je omejujoč dejavnik biotske komponente. V prvi vrsti pomeni odsotnost oksigenih fotosintetskih primarnih producentov, torej rastlin, alg, cianobakterij in anoksigenih primarnih producentov. Pri jamski favni pa povzroči zmanjšano tvorbo oz. odsotnost pigmenta in zakrnitev vidnega aparata. Prilagoditev na iskanje hrane, boj s predatorji in parjenje v temi je vodila k razvoju večine troglomorfnih sprememb. Živali so razvile podaljšane izrastke, tipala ter z izostrenim tipom nadomestile pomanjkanje vida (Culver in Pipan, 2009).

Flora se navadno pojavi le pri dovolj velikih in položnih vseh v jamo. Tam uspevajo nekatere sencoljubne rastline in alge, ki jim šibka svetloba energetsko odgovarja (Gams, 2004).

Favno, ki jo zasledimo v podzemlju, delimo glede na njen odnos do habitata: troglobionti so popolnoma prilagojeni, stalni prebivalci jam, troglofili jame le občasno naselijo za prezimovanje, hranjenje ali parjenje, troglokseni, ki se v jamah največkrat znajdejo pomotoma, pa v takšnih pogojih ne preživijo (Culver in Pipan, 2009).

2.2.3 Okoljski parametri

Glede na površje so okoljski pogoji v podzemlju veliko bolj stabilni, vendar niso konstantni. Nihanje temperature je sicer minimalno ter se odraža le na nivoju letnih ciklov, medtem ko so nivo vodne gladine, zračni tokovi, vlaga in vnos hranil v jamo variabilni (Culver in Pipan, 2009). Obiskovalci jamskih sistemov so dodatni dejavnik, ki vpliva na mikroklimo (vlaga, koncentracija CO₂, temperatura), kar je še posebno opaziti v jamah z množičnim turizmom (Adetutu in sod., 2012).

Pri jamah, ki so povezane s površjem, se zaradi razlike v parcialnem tlaku CO₂ izloči soga, ki tvori jamski inventar npr. kapnike, zaves, sigove kope, cevčice, ponvice, itd.. Posledično je v jamah povišana koncentracija CO₂.

Temperatura v jami je odvisna od klimatskega območja, v katerem se nahaja in tekom leta odstopa le za nekaj odstotkov od razlike v temperaturi na površju (Culver in Pipan, 2009). Jame v Sloveniji imajo večinoma od 7 °C do 11 °C, izjeme so visokogorske in ledeniške jame, v katerih je temperatura nižja. Kroženje zraka v jami je odvisno od zunanje temperature, števila odprtih vhodov jame in od naklona terena. V jamah, ki se od vhoda dvigajo, se zadržuje topel zrak, in so bile v času naseljevanja bolj primerne za zavetišče. Pozimi hladnejši zrak od zunaj izpodriva toplejšega v jami, poleti se tok obrne. V sistemih z več vhodi, po možnosti na različni višini, občutimo prepih čez vse leto, ki je v nekaterih jamah zelo močan (Gams, 2004).

2.2.4 Energetski spleti

V različnih predelih notranjosti jame, kljub stabilnosti nekaterih parametrov okolja, prihaja torej do velikih razlik v pogojih za razvoj prehranjevalnega spleta. Pretočni rovi na primer prejmejo več hranil in biomase kot nekateri suhi rovi, kjer so pogoji bolj podobni puščavam (Culver in Pipan, 2009; Engel, 2010).

Karbonatne jame in večina podzemnih habitatov so v primerjavi s površjem, zaradi odsotnosti fotosinteze in same izoliranosti sistema, podhranjena okolja. Razpoložljivi viri hranil za mikroorganizme so atmosferski plini, raztopljena organska snov ter reducirane kovine v kamninah (Mulec, 2008). Vsi ti viri so časovno in prostorsko nestanovitni ter nihajo v količini in kvaliteti. Poleg fizioloških, troglomorfnih sprememb, je za preživetje v podzemlju pomembna tudi prilagoditev na stradanje. Načeloma je eutrofikacija podzemlja rezultat onesnaženja in intenzivne kmetijske rabe področja, razen v redkih primerih, kjer je visoka vsebnost hranil naravna posledica kot npr. iztrebki velike kolonije netopirjev (Culver in Pipan, 2009).

Sistemi nastali s korozijo žveplene kisline in kjer imajo organizmi na voljo žveplene molekule, omogočajo dober energetski potencial za obstoj življenja. V takšnih jamah so odkrili popolnoma samozadostne ekosisteme, ki temeljijo na bakterijski kemotsintezi organskega ogljika (Mulec, 2008).

2.3 JAMSKI SEDIMENTI

Sedimentni delci so netopni ostanki raztapljanja, mehničnega preperevanja in vodnih nanosov, ali nastanejo s precipitacijo (White, 2007). Jame predstavljajo idealno okolje, v katerih se ta material dolgotrajno skladišči v stabilnih pogojih, kjer se njihove lastnosti in struktura ohranjajo.

Sestava ter kopičenje sedimentov v jami sta dokaj kompleksne narave in trenutno kriteriji za klasifikacijo jamskih sedimentov še niso povsem enotni v literaturi. Slednji opis je

kompromis obstoječih definicij, kjer jih ločimo na kemične in klastične. Kemični so rezultat precipitacije mineralov iz korozijske suspenzije, nasičene z raztopljenimi ioni kalcija, sulfata, bikarbonata itd. Odlagajo se na mestu nastanka in tvorijo jamsko sigo. Klastične sedimente, ki se odložijo v jami tekom mehanskega prenos delcev delimo glede na okolje iz katerega izvirajo. Avtohtoni nastajajo v jami, alohtoni pa so vneseni v jamo iz njene okolice. Med prve uvrščamo netopne komponente raztopljenih kamnin ter odkrušene kose jamskih struktur, sten in stropa. Material, ki se iz površja izpira v jamo z rečnim tokom imenujemo aluvij, in predstavlja največji delež alohtonih sedimentov. Preostali del prispeva meteorno izpiranje skozi dovolj razširjene kanale in brezna v neprežeti coni, erozijsko posipanje, vnos z vetrom in redki vendar masovni vnos materiala zaradi plazov. Pri alohtonih delcih je sestava sedimenta odvisna od okoliškega terena in porečja ponikalnice. Vsi tipi klastičnih sedimentov pa se v vodonosniku med seboj premešajo, kar otežuje njihovo razvrščanje (White, 2007). Od vseh naštetih sta v večini jam količinsko prevladujeta aluvij in odkrušeni kosi zrušenja stropa ali sten. Preko tega v grobem privzamemo, da so delci, ki so enake kamninske sestave kot jama, avtohtoni klastični sediment, za silikate pa sklepamo, da so nanosi aluvija. Vendar pa se moramo zavedati, da se fini silikati pogosto pojavljajo kot vezivo v apnencu in so navadno vir lepljive glin v jamah brez vodnega toka. V tem primeru gre za avtohtone netopne ostanke raztopljene kamnine (Sasowsky, 2007).

Za študijo klastičnih jamskih sedimentov je poznavanje hidrološke dinamike v različnih predelih jame ključnega pomena (White, 2007). V nekaterih sistemih je pretok vode stalen, v drugih občasen, lahko je v neki točki spremenil koridor ter je jamo obšel, ali pa je povsem odsoten pri jamah nastalih ob prelomu. Prav tako je sam tok v jami odvisen od razmer na površju ter razpoložljivega razlivnega prostora v podzemlju. V Švici je znan ekstremni primer, kjer poplave povzročijo dvig vodne gladine v jami tudi do 250 metrov (Sasowsky, 2007). Nihanje vodnega toka posledično vpliva na občutljivost podzemnega sistema, obstojnost združbe v njem in na sposobnost regeneracije podzemnega sistema v primeru onesnaženja (Barton, 2006)

Usedanje delcev, ki jih tok lahko nosi, je odvisno predvsem od njihovega premera in hitrosti toka. Z njima je določeno razmerje med količino odloženega in iznesenega materiala, obstojnost skladov ter velikost delcev v skladih. Turbulentni tok ohranja drobni

material v suspenziji, medtem ko se težji in večji delci posedajo. V jamah s stalnim pretokom je sediment večinoma izpran, saj se fin material odplakne. V takšnih sistemih se drobnozrnati sloji pojavijo v občasno poplavni coni, kjer voda po normalizaciji piezometrične gladine zastaja (White, 2007).

Povezava med stratigrafskimi sloji klastičnih sedimentov in kronologijo je bila vzpostavljena že v začetku 17. st. Prenos tega znanja pod površje, na jamske sedimente je bilo le vprašanje časa. Prve obsežne datacije in primerjave starosti različnih jamskih sedimentov v Sloveniji je v letih 1976, 1982 in 1988 opravil Gospodarič (Zupan in sod., 2010). Njihova analiza je orodje za določitev časovnega okvira starosti jam. Teoretično klastični sedimenti prednjačijo pred kemičnimi, saj ti nastajajo preko dolgotrajnejšega procesa in predstavljajo zgornjo mejo starosti vendar le, če odkrijemo mesto s primarnimi nanosi klastičnega materiala (Sasowsky, 2007). Preko analize mineralogije glinenih delcev, zaporedja in debeline stratigrafskih pasov lahko dobimo paleoklimatske informacije o dobi, v kateri so depoziti nastali. Določanje te dobe pa poteka preko orientacije magnetnih delcev v slojih in z radiometričnimi meritvami. Med slednjimi je zaradi specifičnosti reakcije in izjemno dolge razpolovne dobe razpada (okoli 5 Ma) zelo obetavna metoda merjenja kozmičnih izotopov v sedimentih, ki pa je še v razvoju. Temelji na meritvi ^{26}Al in ^{10}Ba izotopov, ki se kopičita v materialu, dokler je le-ta izpostavljen visoko energetskim kozmičnim sevanjem na površju. Ko se je aluvij vnesel v jamo, ti delci, predvsem alumosilikati, niso bili več izpostavljeni žarkom in poteka samo še njun razpad. Z uporabo masnega spektrometra s pospeševalcem določijo razmerje koncentracij izotopov v primerjavi z materialom na površju ter ocenijo, kdaj je material prineslo v jame (White, 2007). Trenutno je najbolj uporabljena uran-torijeva (Th/U) metoda, ki meri razmerje izotopov razpadlega urana v sigi in je zanesljiva do 0,4 Ma. Ker je torijev izotop za razliko od uranovih netopen, je povečanje njegove koncentracije v sigi geokronometer za datacijo. Pred to metodo je bilo glavno orodje določanja starosti razmerje izotopov ogljika ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) v kalcitu. Zaradi krajše dobe zanesljivosti datacije (35 Ka) jo uporabljajo le še za merjenje hitrosti rasti sigovih tvorb (Gams, 2004).

Vse te lastnost postavljajo jamske sedimente v ospredje današnjih speleoloških raziskav. Z izpopolnjenjem metod in znanja imajo možnost doseči enako vlogo kot raziskave ledeniških in globokomorskih sedimentnih jeder v odkrivanju klimatskih razmer preteklih

geoloških dob. Z uporabo metod za natančnejšo analizo holocena, imajo potencialno uporabnost v raziskavah globalnega segrevanja (White, 2007).

2.4 ŠTUDIJE MIKROORGANIZMOV V JAMAH

Jamska mikrobiologija je bila pred kratkim priznana kot interdisciplinarno področje, ki povezuje mikrobiologijo z geologijo in kemijo. Glavni predmet raziskav so mikrobne oblike življenja v jamah ter njihov vpliv na tamkajšnje okolje (Mulec, 2008).

Pri večini študij opazno izstopajo tri tematike glede na namen raziskave. Jamska geomikrobiologija proučuje interakcije mikrobov z geološko osnovo, kamnino ter rešuje dilemo vloge mikroorganizmov pri nastanku jam in sigovih tvorb (Jones, 2001; Barton in Northup, 2007). Speleobiologe zanima celokupni vpogled v jamske mikrobne združbe in njihova medsebojna in okoljska povezava (Engel, 2010; Culver in Pipan, 2009). Zaradi vse bolj vidnega vpliva množičnega turizma na jamsko bioto, se mnogo znanstvenikov posveča in izpostavlja reševanje problematike spreminjanja mikroklima ter parazitskim vrstam v urejenih jamah (Adetutu in sod, 2012; Portillo in Gonzalez, 2009).

2.4.1 Mikrobna raznolikost in porazdelitev v jamah

V okolju z manj kot 2 mg skupnega organskega ogljika (angl.: TOC – *Total Organic Carbon*) na liter snovi, so organizmi podvrženi stradanju. V jamah ta vrednost redko preseže 0,5 mg/l, kljub temu poročajo po svetu in pri nas o številu mikrobnih celic čez 10^6 CFU (angl.: *Colony Forming Units*) na gram materiala (Mulec, 2008). Sposobnost črpanja energije s kemosintezo omogoča bakterijam prednost v takšnem okolju, kemolitoavtotrofi pa so povsem neodvisni od vira organske snovi in svetlobe (Engel, 2012).

Mikroorganizmi s svojo aktivnostjo spremenijo podlago, na katero so pritrjeni. Posledično pogosto nastanejo očem vidne strukture, po katerih sklepamo na njihovo prisotnost. Med te prištevamo nastanek biofilmov, neobičajne obarvanosti sige, pike na površinah, nastajanje biološko pogojenih kraških struktur (npr. angl.: *Pool Fingers*, *Moonmilk*,) značilne ostanke korozije in biogenega minerala. Kjer je meja med geološkimi procesi in posledicami biogenega delovanja še nejasna in kar geologija ni zmožna razložiti z anorganskimi in kemičnimi procesi, je najverjetneje posledica mikrobne aktivnosti (Barton, 2006).

Mikrobne celice v jami vnašajo in prenašajo enaki vektorji kot klastične jamske sedimente (aluvialno, aerosolno, erozijsko, korozijsko) ter preko rastlin, živali in človeka. Izhajajo torej iz različnih vrst okolja (voda, tla, atmosfera, organizmi) ter se tako kot sedimenti dolgoročno ohranjajo v jamskem okolju (rezervoar) ali pa se z vodnim tokom izločijo (Engel, 2010). Večina mikrobnih celic, ki jih zanese v podzemlje, ne razvije mehanizmov prilagoditve na podhranjenost habitata. V primeru občasnega vnosa večje količine alohtonega vira hranil (onesnaženje, odmrle živali, iztrebki, itd.) se namnožijo in ko vir presahne, večinoma odmrejo. Biomasa odmrlih celic služi kot pomembni vir hranil ostalim jamskim prebivalcem višjih trofičnih nivojev (Mulec, 2008).

V jamah so zastopani vsi predstavniki mikroorganizmov. Cianobakterije in mikroalge rastejo v osvetljenih predelih vhoda in mračne cone, v notranjosti jam jih najdemo v vodi, okoli umetnih svetil v turističnih jamah tvorijo preproge na stenah, t.i. »lampenflora« (Mulec, 2008). Praživali so trenutno še slabo proučene, najpogostejše so opisane v vodnih telesih. Pri glivah, zaradi prilagodljivosti in pestrosti metabolnih poti, zasledimo raznolike interakcije s preostalimi organizmi in okoljem. Bakterije zasledimo v vodi, sedimentih in na kamnini, torej v večini jamskih niš (Mulec, 2008).

Oblika jame, dostop vode in svetlobe v največji meri narekujejo dejavnike okolja, od katerih je odvisna številčnost in porazdelitev biotopa v sistemu. Razlike v koncentracijah (vode, svetlobe, kovin, raztopljenega kisika, itd.) vodijo v nastanek geokemičnih gradientov, ki določajo potencial kolonizacije površine. Glede na jakost svetlobe ločimo tri večje habitatne cone pri jamah, ki so povezane s površjem: vhod, območje somraka in temno cono. Vsaka ima specifične lastnosti, fizikalno-kemijske pogoje in vsebnost hranil (Engel, 2010). Mikroorganizmi naseljujejo vse tri svetlobne cone, vendar se močno

razlikujejo v sestavi, funkciji in interakcijah z okoljem. Ob vhodu in v conah somraka zasledimo cianobakterije in mikroalge, ki so prilagodile biosintezo pigmentov nizki koncentraciji fotonov. Blizu točk vnosa organskih snovi v jame zasledimo značilne biofilme na stenah in stropu, ki so jim nadeli ime jamsko zlato ali srebro. Ob osvetlitvi takšnih mikrobnih prevlek opazimo lesket pigmentov kolonij, najpogosteje rumene ali bele barve, na kapljicah vode, ki zaradi mešanja hladnega in toplega zraka kondenzira (Mulec, 2008). V afotični, temni coni, kjer fotosinteza ni možna, predstavlja vnos alohtone organske snovi glavni vir hranil. Tu zasledimo predvsem litogene in litolitične bakterijske združbe (Engel, 2010). V posebnih okoliščinah pa se jamski ekosistem lahko vzpostavi na račun sinteze avtohtonega organskega ogljika. V podzemnih sistemih s povišano vsebnostjo žvepljenih snovi, zlasti reduciranih, so dokazali prisotnost kemolitoavtotrofnih bakterij, ki oksidirajo molekule žvepla in fiksirajo CO₂ v organski ogljik – biomaso. Njihov metabolizem je gonilo prehranjevalnega spleta ter vpliva na spremembo pH okolja, vsebnost kisika, organskega ogljika, skratka omogoča razvoj unikatne združbe (Mulec, 2012).

Od identificiranih bakterijskih debel v raziskavah najpogosteje zasledimo filamentozne aktinobakterije in proteobakterije. Med prvimi najdemo mnoge predstavnike, za katere je značilna sinteza sekundarnih produktov, kar postavlja jame med potencialna okolja za odkritje organizmov, ki sintetizirajo biotehnološko uporabne produkte (Engel, 2012).

2.4.2 Pregled študij jamske mikrobiologije

Dejstvo, da nam je večina podzemlja nedostopna, ter sama občutljivost habitata na vnos snovi in organizmov ob prodiranju do njih, onemogočata celostni vpogled v takšne sisteme v njihovem izoliranem stanju (Engel, 2010). Težka dostopnost večine jam še danes predstavlja oviro pri pridobivanju vzorcev in spodbuja k razvoju opreme, prilagojene takšni dejavnosti. Ta mora ustrezati zahtevam po specifičnosti in občutljivosti, lahki uporabi in ponovljivosti, lahki prenosljivosti in finančni dostopnosti (Mulec, 2012; Mulec in sod., 2012a).

Prve mikrobiološke raziskave so temeljile na tradicionalnih gojitvenih in mikroskopskih tehnikah. Z rezultati so potrdili prisotnost mikrobnih združb v vodi in sedimentnih nanosih, v manjši zastopanosti in pestrosti kot v tleh. Pri nas sta prve raziskave opravila Megušar in Sket (1977) z analizo organskih prevlek na stenah Planinske jame (Mulec, 2012). Sklepali so, da so odkriti mikrobi preneseni v jame s površja ter nimajo posebnega pomena ali dolgoročnega obstoja v habitatu. Kljub pomanjkanju dokazov so pri nekaterih nitratnih, karbonatnih mineralih in oblikah sige v jami sumili, da gre za biološko delovanje. Z odkritjem železo-manganovih in žveplo oksidirajočih bakterij so z biogenim nastankom povezovali tvorbe železovih in manganovih oksidov (Spilde in sod., 2005) in potrdili ključno vlogo žvepljenih bakterij pri jamah, ki so nastajajo z raztapljanjem apnenca z žvepleno kislino (Engel, 2012). Z odkritjem mikrobnih celic v sigovici so skušali dokazati povezavo med precipitacijo mineralov jamske sige in metabolizmom mikrobov (Northup in Lavoie, 2001). Geologi so bili mnjenja, da prisotnost mikroorganizmov še ne pomeni, da imajo vlogo pri strukturiranosti jame ter vztrajali pri abiotski, kemični razlagi pojavov. Pri reševanju te dileme se je pojavil problem, opazen pri večini takratnih študij: enoličen pristop, preko geologije ali mikrobiologije, s preslabim poznavanjem nasprotnega tabora, kar se je odražalo predvsem v neprimerni metodi vzorčenja, tehniki dela in nasprotujočih si končnih sklepih (Jones, 2001). Raziskovalci so ta problem premostili z razvojem jamske geomikrobiologije, ki vlogo mikrobov pri nastanku kalcitne sige proučuje še danes.

V raziskavi stromatolitskih kapnikov v Škocjanskih jamah so Mulec in sod. (2007) dokazali, da je v vhodnih delih jam odlaganje biokalcita pospešeno na prisojni strani kapnikov prerasli s cianobakterijami, med katerimi so določili rodova *Calothrix* in *Homoeothrix* (Mulec, 2008). Banks in sod. (2010) pa sklepajo, da je precipitacija kalcita le obrambni mehanizem pred vdorom kalcijevih ionov iz sigovice v celico. Sam proces je namreč s stališča preživetja teh bakterij neugoden, saj povzroči odlaganje mineralov na celični površini, kar prepreči nadaljnji prenos snovi in povzroči njen propad.

V žvepleni jami na jugu Romunije so Sarbu in sod. (1996) odkrili unikatni prehranjevalni splet, katerega gonilo so bakterije, ki proizvajajo organski ogljik. Ta študija je predvsem izpostavila vlogo kemosinteze bakterij v afotičnih sistemih in številčnost metabolno aktivne biomase (Engel, 2012). Raziskave mikrobnih prevlek na jamskih poslikavah v Španiji in na jugu Francije so dale pomemben prispevek pri analizi litolitične in litogene

funkcije mikrobov v jamah. Te združbe, ki s precipitacijo mineralov ali razgradnjo podlage povzročajo škodo, so hkrati botrovale odkritju, da mikroorganizmi sodelujejo pri dinamiki nastanka in razpada jam (Mulec, 2008).

Od razmaha uporabe molekularnih tehnik v analizi jamskih združb je pregled molekularnih zaporedij v 20-tih letih pokazal, da so si podatki različnih raziskav po svetu dokaj podobni, vendar se raziskave odvijajo v premajhnem naboru in raznolikosti habitatov. V jamah so identificirali približno tretjino vseh znanih bakterijskih debel in polovico arhejskih, evkarionti pa so bili večinoma opisani na osnovi fenotipskih znakov. Od bakterij v mikrobnih prevlekah prevladujejo aktinobakterije, najbolj zastopan rod so *Streptomyces*, *Nocardia* in *Mycobacterium*. Proteobakterije, predvsem razred β -proteobakterij, rodova *Gallionella* in *Leptothrix* so pogoste v alohtonih nekarbonatnih sedimentnih nanosih. Rodove razredov β -, γ - in ϵ -proteobakterij, najpogosteje zasledimo v žvepljenih jamah, kjer omogočajo nastanek sige, med njimi so žveplo oksidirajoče proteobakterije ključne pri kemoavtotrofni sintezi organskega ogljika. Od arhejskih debel so v sedimentih in ostankih korozije na stenah odkrili predstavnike iz kraljestva Crenarchaeota in Euryarchaeota, ki oksidirajo železo in mangan (Engel, 2012).

Ker so raziskave jamske mikrobiologije šele v začetni fazi, je trenutni cilj pridobivanje čim več podatkov o porazdelitvi in identifikaciji združb v jamah in okolici, analiza večjega števila jamskih sistemov v različnih klimatsko-hidroloških situacijah, analiza različnih niš znotraj sistemov, razvoj primerne terenske opreme, itd. Pri postavljanju hipotez prihodnjih študij je pomembno tudi poznavanje izvirnega okolja mikrobov iz katerega so se prenesli v jame. Preko te biogeografske informacije lahko preverimo tip vnosa materiala v jame, ugotovimo povezavo podzemlja s površjem, ali ovrednotimo endemičnost organizmov. Z datacijo sedimenta, iz katerega izoliramo mikrobovno združbo, dobimo podatek o času vnosa bakterij v podzemni sistem ter sledimo poteku genetskih prilagoditev mikrobov na podhranjene sisteme. Primerjalna študija mikrobnih združb v različnih tipih jam nam lahko pove, kako geološka osnova, nastanek jam, hidrološki profil jame in geokemija vplivajo na strukturo in raznolikost mikrobov. Težave pri interpretaciji rezultatov nastopijo predvsem pri ločevanju endemične združbe od trenutnega vdora v okolje ter ločevanje dobljenih nukleinskih zaporedij živečih organizmov od odmrlih (Engel, 2010).

Odkritje edinstvene strukture in funkcije, ki jo predstavlja očem nevidni svet v jamah, in želja po ohranitvi ekosistema v raziskovalne namene, je povečalo potrebo po zaščiti podzemnih habitatov (Barton, 2006). Trenutno je v teku projekt KROW (*Karst Regions Of the World*), ki popisuje vsa kraška področja po svetu z namenom vzpostavitve baze podatkov in ohranjanja teh habitatov. Izvajajo se študije vpliva ksenobiotikov na podzemne sisteme, predvsem na delovanje in porazdelitev mikrobnih združb, ter vpliv sprememb na zdravje podzemlja in pitnost vode (Chelius, 2009; Barton in sod., 2010; Mulec in sod., 2012a).

Slovenija je ena izmed redkih držav z Inštitutom za raziskovanje krasa, kjer se ukvarjajo izključno z jamsko mikrobiologijo. V članku redne publikacije inštituta, *Acta Crasologica*, je Mulec (2008; 2012) povzel zgodovino mikrobioloških raziskav na naših tleh.

V prvi analizi mikrobnih prevlek na stenah Planinske jame sta Megušar in Sket (1977) določila njihovo sestavo z mikroskopijo in gojenjem izolatov v laboratoriju. Večina združbe so predstavljali Gram pozitivni koki in palčke, do laboratorijskih kultur so vzgajali bakterije iz rodu *Bacillus subtilis*, *B. brevii*, *B. cereus*. Poleg bakterij so bile v združbi prisotne tudi glive iz rodov *Penicillium* in *Aspergillus*. V Pajsarjevi jami so Pašić in sod. (2010) s klonskimi knjižnicami določili sestavo biofilma jamskega srebra ter določili 8 bakterijskih debel v vzorcih. Prevladovali so predstavniki γ -proteobakterij, aktinobakterije in rod *Nitrospira*, kar kaže na ujemanje rezultatov z raziskavami v tujini.

Poleg mikrobnih prevlek so proučevali mikrobne združbe na osnovi morfologije in biokemičnih testov v preperem apnencu, v jamski ponvici z aktivno odlagajočo sigo, v kondenzacijskih kapljicah organskih prevlek in v jamskem mleku (angl.: *moonmilk*) (Mulec in sod., 2002). V dobljenih vzorcih so prevladovale pseudomonade, najverjetneje zaradi pestrega nabora metabolnih poti. Zanimiva raziskava je potekala v pronikli vodi v Škocjanskih jamah (Gerič in sod., 2004). Z analizo so ugotovili, da se preko enega vira dnevno vnese 10^4 bakterij v sistem. Pri določanju sestave te združbe so odkrili zelo malo po Gramu pozitivnih bakterij in nobene aktinomicete, večinoma se prevladovale bakterije iz družin Enterobacteriaceae in Vibrionaceae.

V letih 1987 do 2005 so v različnih podzemnih sistemih določili 197 taksonov cianobakterij in mikroalg. Nekatere so izolirali iz osvetljenih sistemov v urejenih jamah v

združbi lampenflore, nekatere pa iz vhodov v jamo, ki rastejo na račun naravne svetlobe aerofitsko. Glive lahko naseljujejo različne vire substratov, navadno uspevajo v združbi z bakterijami, v jamah zasledimo tudi koprofilne in entomopatogene vrste. Na slednjih je bilo opravljenih največ raziskav (Zalar in sod., 1997; Gunde-Cimerman in sod., 1998; Tkavc, 2007). Tudi praživali še niso dobro raziskane v naših podzemeljskih sistemih, čeprav predstavljajo ključno vlogo pri mikrobni zanki in prenosu energije v ekosistemu (Walochnik in Mulec, 2009).

Na sedimentih je bilo opravljenih zelo malo mikrobioloških raziskav za razliko od številnih datacij in geoloških študij po različnih jamah v Sloveniji. V diplomskem delu je Zakotnik (2011), s konstrukcijo genskih knjižnic določila glavne predstavnike debel mikrobne združbe v sedimentu iz Postojnske jame, v Rovu koalicije, kjer je bila opravljena tudi datacija in odvzem vzorcev v naši raziskavi. Od bakterijskih debel izstopajo okoljsko najpogostejše zastopane proteobakterije, sledijo jim bakterije iz debel *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* in *Nitrospira*. V povezavi s podatki o starosti sedimenta vzorčenih mest so potrdili, da mikrobna aktivnost s starostjo sedimenta upada (Mulec, 2012). V opisani raziskavi (Zakotnik, 2011) so opravili analizo sedimenta znotraj določenega predela ene jame. Pri našem delu smo se zato osredotočili na primerjavo sedimenta med štirimi različnimi jamskimi sistemi ter pri nekaterih tudi med različnimi vzorčenimi mesti znotraj posamezne jame.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 SEZNAM UPORABLJENEGA MATERIALA

3.1.1 Reagenti, pufri in encimi

Kemikalije:

- ⤴ Na_2CO_3 (Merck KgaA, Nemčija)
- ⤴ KCl (Merck KgaA, Nemčija)
- ⤴ 5 x TBE pufer (Merck KgaA, Nemčija)
 - 54 μl Tris baza
 - 27,5 μl Borova kislina
 - 20 μl 0,5 M EDTA
- ⤴ Agaroz (SEAKEM™, Marine Colloids, Inc. ZDA)
- ⤴ Nalagalni pufer, bromfenol modro: $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{S} \times \text{Na}$ (Serva, Nemčija)
- ⤴ Pufer restrikcije endonukleaze *BsuRI* (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)

Mešanica reagentov za reakcijo PCR:

- ⤴ Sigma voda (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- ⤴ MgCl (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- ⤴ BSA (Bovina Serum Albumin) (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- ⤴ dNTP (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- ⤴ 926R, 27f začetna oligonukleotida (Microsynth AG, Švica)
- ⤴ 518R začetni oligonukleotid (MWG Biotech AG, Nemčija)

Encimi:

- ⤴ Polimeraza *Taq* (izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*) (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)
- ⤴ Endonukleazni encim *BsuRI* (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)

DNA standardi:

- ⤴ Interni standard kapilarne elektroforeze GeneScan™ -500 ROX (Life technologies; Applied Biosystems, ZDA)
- ⤴ DNA lestvica GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA)

Kompleti:

- ⤴ UltraClean Soil Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc. ZDA)
- ⤴ High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija)

3.1.2 Laboratorijska oprema

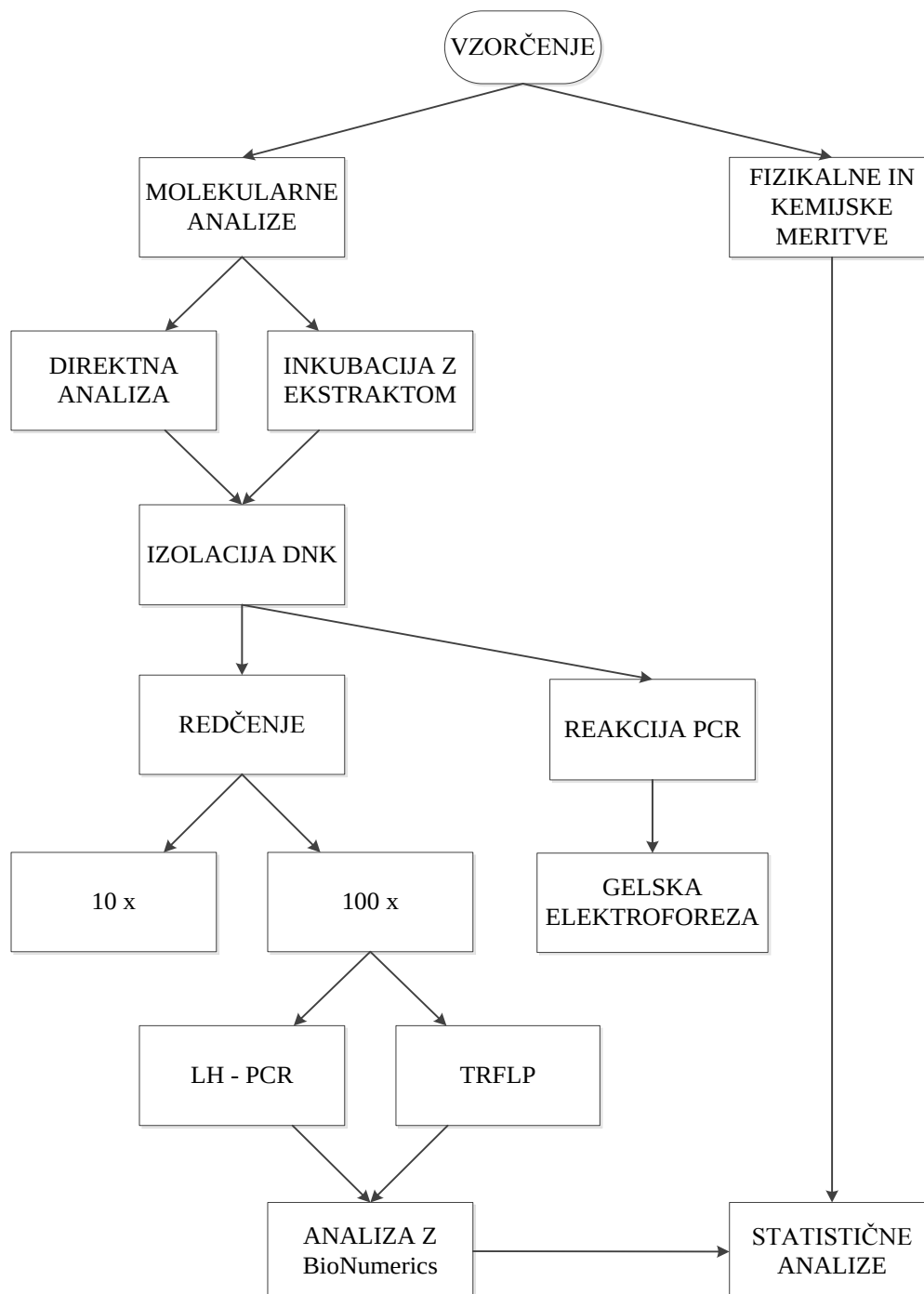
- ⤴ 0,2 mm sito (200 mm Ø x 50 mm ISO 3310/1, Retsch, Nemčija)
- ⤴ Avtoklav A-21CA (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija)
- ⤴ Centrifuge
 - Do 12 vzorcev: F-45-12-11 (Eppendorf, Nemčija)
 - Do 24 vzorcev: Mikro R-200 (Hettlich Zentrifugen, Nemčija)
- ⤴ Ciklični sistem reakcije PCR (MyCycler™, thermal cycler, Bio-Rad Laboratories, ZDA)
- ⤴ Kivete Hellma 115-QS (Hellma, Nemčija)
- ⤴ Laboratorijske rokavice duoShield™ (Shield Scientific, Nemčija)
- ⤴ Mikrotitrna ploščica (Cellstar®, ZDA)
- ⤴ Mikrovalovna pečica R202 (Sharp, Japonska)
- ⤴ Nastavki za pipete Plastibrand (Brand GmbH Co. KG, Nemčija)

- ✧ Nitrilne rokavice Purple Nitrile Exam Gloves (Kimberly Clark, ZDA)
- ✧ pH elektroda (Ross® pH-Electrode 8162 Plus, Orion, ZDA)
- ✧ pH meter (520A, Orion, ZDA)
- ✧ Plastične epruvete (BD Falcon™)
- ✧ Polavtomatske pipete (Finnpipette, ZDA)
- ✧ Spektrofotometer Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japonska)
- ✧ Stresalnik Tehnica RVI-403 (Tehnica Železniki, Slovenija)
- ✧ Tehnice
 - Kern 442-43N (Kern & Sohn GmbH, Nemčija)
 - Kern Alt 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Nemčija)
- ✧ Termostatska pečica Instrumentaria ST-05 (Instrumentaria, Hrvaška)
- ✧ Vibracijski mešalniki:
 - Horizontalni: Vortex-Genie 2 (Scientific industries, ZDA)
 - Nastavek za stresalnik: Vortex adapter (MoBio Laboratories, Inc. ZDA)
 - Navadni: Zx³ (Velp Scientifica, Italija)
- ✧ Žarilni lončki (Staatlich, KPM Berlin, Nemčija)

3.2 PRIDOBIVANJE DOVOLJENJ

V skladu z Zakonom o varstvu podzemnih jam (2004) smo v sodelovanju z dr. Janezom Mulcem, Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, vložili vlogo za odvzem vzorcev. Na območni enoti Ljubljana, Zavoda RS za varstvo narave, so odobrili vlogo št. 45/91-1/11, za vzorčenje Križne jame (katastrska št. 65) in Rimljanke (neregistrirana jama). Pod isto številko vloge, smo na območni enoti Nova Gorica dobili soglasje za delo v Veliki ledenici v Paradani (kat. št. 742) ter v Postojnski jami (kat. št. 747) s št. vloge 45/80-9/11. Dovoljenja je pridobil in jih hrani Inštitut za raziskovanje krasa, ZRC SAZU, Titov trg 2, 6230 Postojna, dr. Janez Mulec.

3.3 SHEMA DELA



Slika 2: Shematski prikaz eksperimentalnega postopka.

3.4 VZORČENJE

Odobritev prve vloge za delo v jamah smo prejeli maja, 2011. Istega meseca smo vzeli vzorec iz Rimljanke, tri vzorce iz ledenice v Paradani in tri iz Križne jame. Konec junija istega leta smo dobili dovoljenje za vzorčenje Postojnske jame, iz katere smo odvzeli dva vzorca. Fizikalno kemijske analize in molekularne raziskave vzorcev iz Postojnske jame so bile, zaradi časovnega zamika v pridobitvi sedimenta, opravljene naknadno.

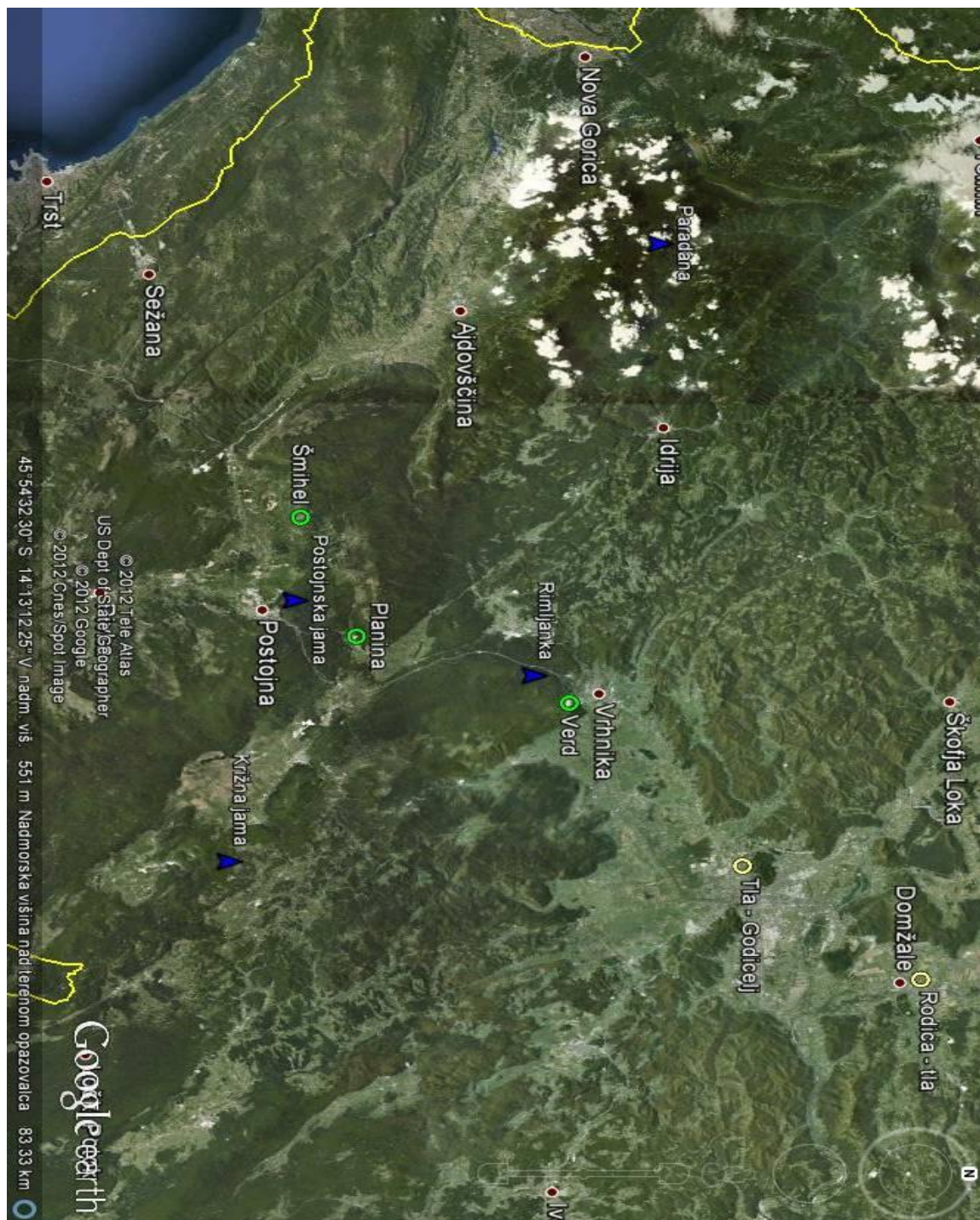
Pri vsakem odvzemu vzorca smo postopali enako. Z jeklenim orodjem, površinsko steriliziranim s 75 % etanolom, smo odstranili do 10 cm vrhnjega sloja. Zaradi uredbenih omejitev pri vzorčenju smo na posameznem mestu vzorčenja odvzeli do 500 g mokre teže sedimenta, le pri tretjem vzorcu iz Paradane, smo lahko vzorčili vzdolž deset metrskega pobočja. Označene vzorce smo v transportnih vrečah prenesli iz jame in jih do nadaljnjih fizikalno-kemijskih analiz shranili pri 6 °C. Iz vsakega vzorca smo za molekularne analize mikrobnih združb pripravili 20 mikrocentrifugirk, s sedimentom do oznake 5 ml ter jih shranili pri -20 °C. Za primerjavo rezultatov in pozitivno kontrolo eksperimentalnega dela smo vzorčili poljska tla (vzorec F1) v bližini stavb oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete na Rodici.

Preglednica 1: Osnovni podatki o vzorčenih jamah.

Ime jame	Katastr- ska št.	Koordinate vhoda	Kota vhoda	Dolžina / globina	Letna T [°C]	Uporaba	Voda	Teren
Velika ledenica v Paradani ^a	742	45°59'19.51"S 13°50'39.17"V	1135 m	4090 m / 650 m	-1,6 do 1, (do globine 180 m)	Izvoz ledu do 20.stol.	Led in ledenica	Vertikalna
Križna jama ^b	65	45°44'42.73"S 14°28'2.24"V	629 m	8273 m / 32 m	7,5 do 8,5	Omejen turizem	Vodo- nosnik	Položna jama
Rimljanka ^c	/	45°55'7.02"N 14°16'46.5"E	530 m	110 m / 50 m	7,5	/	Ni pretoka	Pretežno vertikalna
Postojnska jama ^d	747	45°46'57.78"S 14°12'13.25"V	529 m	20570 m / 115 m	10,7 do 11,9	Redni turizem	Reka Pivka	Položna jama

Numerični podatki so povzeti iz polletnega poročila katastra JZS, 2012a.

Viri podatkov o temperaturah v jami: a – (JD Logatec, 2002), b – meritve iz zapisnikov jamarskega katastra, c – (Jeraj, 2012), d – (Mulec in sod, 2012b) .



Slika 3: Označene lokacije vseh vzorčenj v raziskovalni nalogi in referenčnih vzorcev (Google earth, 2012).

▲ : Koordinate vhodov vzorčenih jam, po podatkih katastra (JZS, 2012)

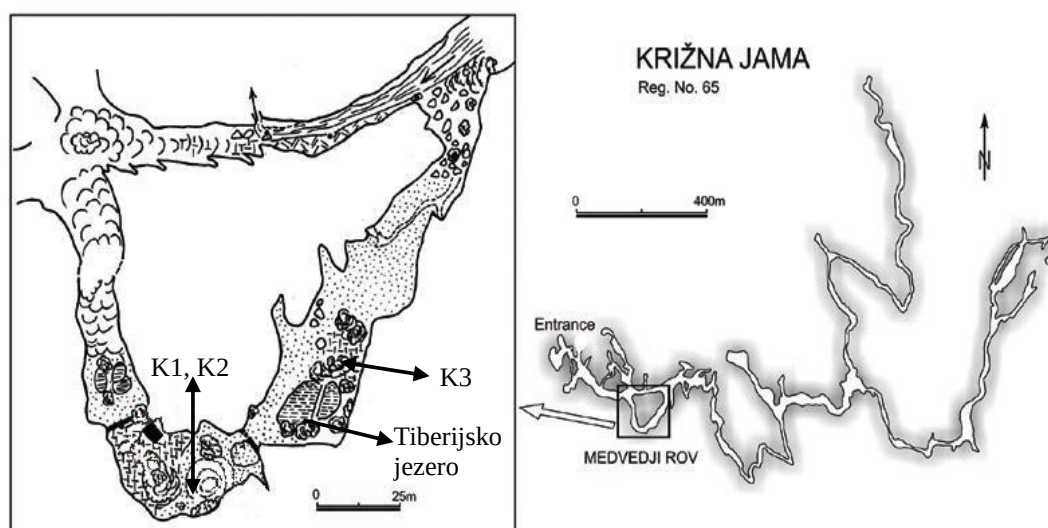
● : Vzorčenje površinskih tal za kontrolo eksperimentalnega dela in pripravo ekstrakta hranil (Rodica) ter referenčni vzorec za primerjavo rezultatov fizikalno kemijskih analiz (Godicelj, 2011)

● : Mesta odvzema kontrolnih vzorcev za določanje ogljika v kamninah in tleh (Glej 4.4.4).

3.4.1 Križna jama

Križna jama se nahaja pod Bloško polico z vhodom na 638 m nadmorske višine (JZS, 2012). Vzorčenje je potekalo v Medvedjem rovu, 325 m dolgem stranskem prehodu jame, ki se dviga okoli 15 m nad gladino potoka v glavnem rovu (Bosák in sod., 2010).

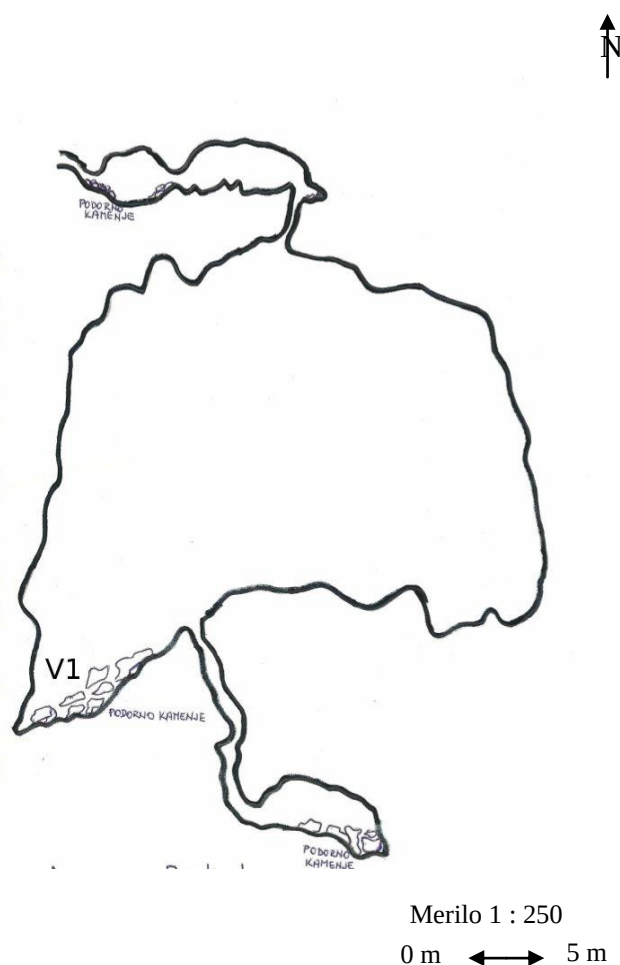
Prvi dve lokaciji smo izbrali na pobočju platoja Hochstetterjeva zakladnica, ki se dviga okoli 10 m nad Tiberijskim jezerom, z vrhom tik pod stropom. Vzdlž zahodne strani platoja je od povrhnje sigove skorje navpično odsekan dvometrski sloj sedimenta, nato se pobočje strmo spušča še okoli 5 metrov. Vzorec K1 smo odvzeli tik pod 30 cm debelo sigovo skorjo, vzorec K2 pa meter nižje v odsekanem sloju, v sedimentnem pasu črnike barve, širokim okoli 20 cm. Tretje mesto vzorčenja smo izbrali pred Tiberijskim jezerom, na ploščadi ki se dviga slab meter nad njegovo gladino. Vzorčili smo pod metrskim previsom sige, ki je visela slab meter od tal. Najverjetneje so pri predhodnih izkopavanjih raziskovalci spodkopali sediment izpod sigove skorje. Nastal je manjši umetni spodmol, znotraj katerega smo odvzeli vzorec K3.



Slika 4: Načrt Križne jame in Medvedjega rova, z označenimi mesti vzorčenja (Bosák in sod., 2010: 533).

3.4.2 Novo odkrita jama Rimljanka

Jamo so odkrili februarja, 2011 ob ostankih rimskega obzidja, na pobočju manjše vzpetine v bližini Vrhnike. Vhod se nahaja sredi mešanega gozda na nadmorski višini 530 m. Jama je nastala v prelomu, ki ga je sila vode dodatno preoblikovala, stalnega pretoka vode nima. Vhodna dvorana poteka tik pod površjem, iz njenega stropa je viden koreninski sistem nad ležečega rastja, na tleh je opazno odlaganje detritnega materiala. Po petmetrski ožini in po dobrih 20 metrov spusta je večja dvorana. Je srednje zasigana, na zahodnem delu so vidni večji odkrušeni kosi stropa, ki so prekriti s finim, lepljivim sedimentnim materialom. Vzorec V1 smo vzeli v najnižji, zahodni točki te dvorane, iz večjega sedimentnega nanosa ob steni jame.

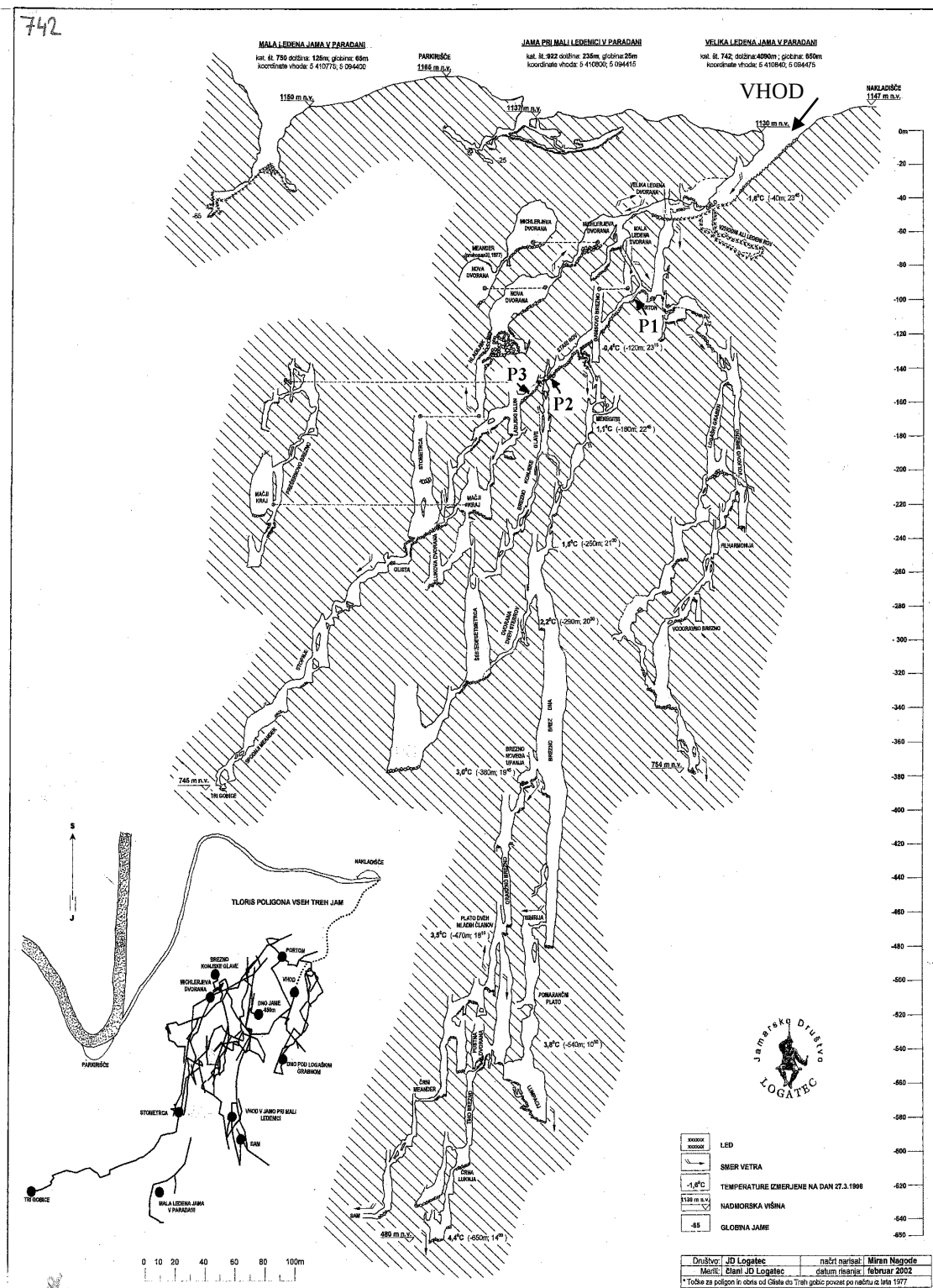


Slika 5: Neuradna skica jame Rimljanka z označenim mestom vzorčenja (Jeraj, 2012).

3.4.3 Velika ledenica v Paradani

Jama se nahaja na dnu vrtače, sredi gozdnate površine. Vhod je v obliki strmega, prodnatega, zaledenelega, okoli 40 m dolgega pobočja. Ob spuščanju je padec temperature občuten, v času vzorčenja je bil še vedno prisoten sneg v vrtači. Po podatkih katastrskega E-zapisnika Jamarskega društva Logatec, je temperatura na prvih nekaj 100 metrov globine pod lediščem, nato tekom jame narašča, do najtoplejše izmerjene točke (4,4 °C) na dnu 650 m globoke jame (JD Logatec, 2002). Med vzorčenjem in predhodnim ogledom jame, je bil stalno prisoten močan preprih. Led v zgornjih predelih brezna jame v celoti pokriva stene, na izravnem terenu se izmenjuje s prodom in odkrušenimi skalami. Finih sedimentnih nanosov je bilo v pregledanem območju do Ladijskega kljuna zelo malo, nekaj ujetih zaplat med skalovjem, večinoma iz grobega peščenega materiala.

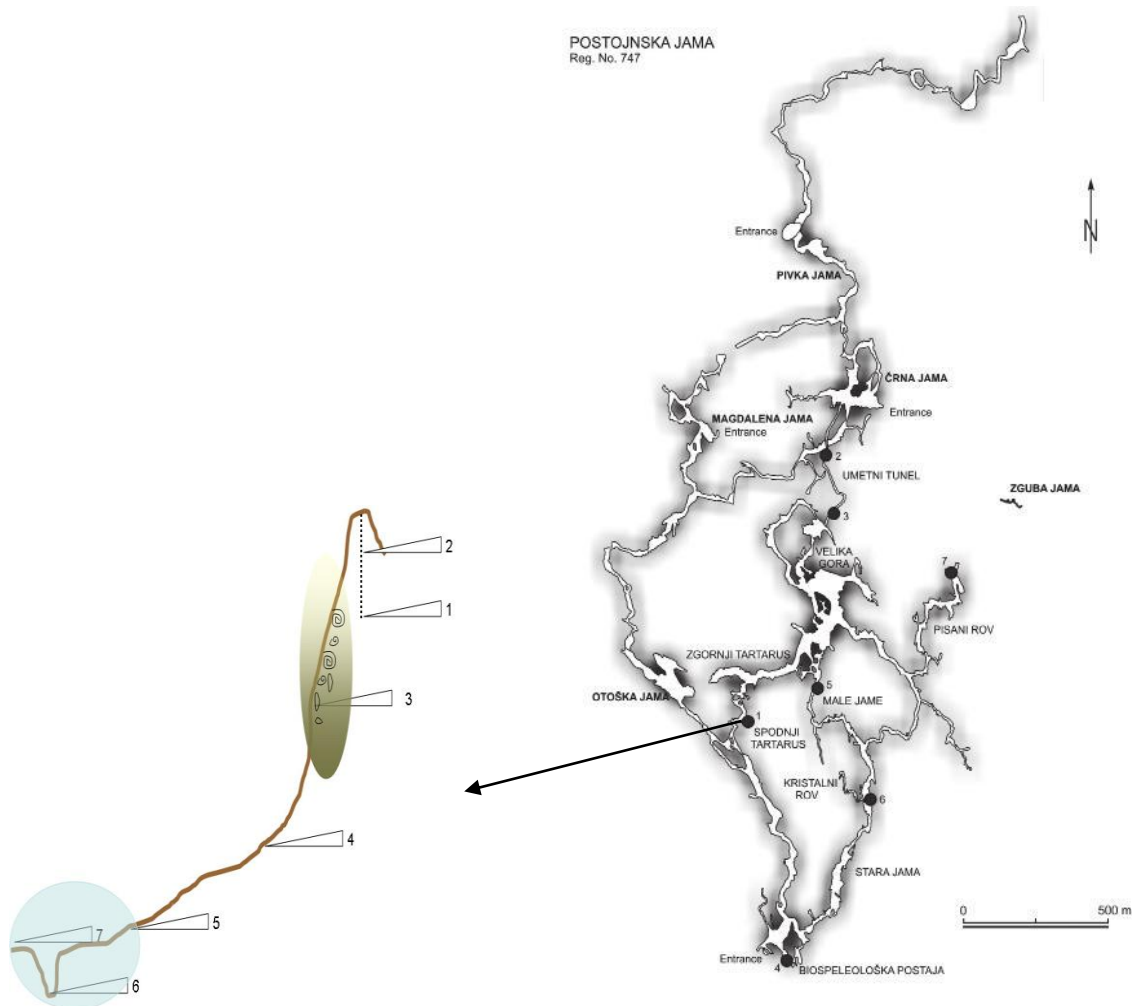
Vzorčenje je potekalo vzdolž temperaturnega gradienta. V jamo smo se spustili preko brezna Porton ter nadaljevali na zahodno stran. Prvi vzorec (P1) smo vzeli iz manjše zaledenele dvorane, okoli 100 m nižje od vhoda, kjer so se med ledeniškimi kapniki in skorjami nahajale posamične zaplate zamrznjenega sedimenta z vidnimi ledenimi kristali. Na prodnatem pobočju pred Gamsovim breznom, na približno 120-tih metrih globine, smo našli zbit, črnkast sloj sedimenta, iz katerega smo odvzeli drugi vzorec (P2). Vzorec P3 smo nabrali z naključnim vzorčenjem po 10 m dolgem prodnatem pobočju pred Ladijskim kljunom, na globini od 150 m do 155 m. Da bi zagotovili čim bolj ustrezno temperaturo med transportom, smo nekaj vreč napolnili s snegom ter z njimi obložili naše vzorce.



Slika 6: Načrt Velike ledenice v Paradani z označenimi mesti vzorčenja P1, P2 in P3 (JD Logatec, 2002).

3.4.4 Postojnska jama

Postojnska jama je z 20,5 km skupne prehodne dolžine drugi najdaljši kraški sistem pri nas. Sestavljata jo zgornji in spodnji nivo, z okoli 18 m višinske razlike. Reka Pivka teče po spodnjem nivoju in med poplavami naraste tudi do 10 m. Spodnji Tartarus, eden izmed povezovalnih rogov med nivojema, leži med 526 m in 533 m n.m.v., med dvigom rečne gladine je predel poplavljen. Na južni strani Spodnjega Tartarusa se odcepi 50 m dolgi stranski rokav Rov koalicije, ki se dviga do 17 m nad rovom in je napolnjen s sedimentom (Zupan Hajna in sod., 2008). Rov koalicije smo vzorčili glede na izpostavljenost sedimenta vodnem pretoku in vplivu človeške dejavnosti. Zaradi nedavne poplavljenosti rova, je bilo najprimernejše mesto za odvzem čimbolj ohranjenega sedimenta za prvi vzorec na vrhu pobočja, kljub vidnim predhodnim raziskovalnim posegom. Vzdlž štirimetrskega navpično odsekanega sedimentnega nanosa smo v višini 1 m od stojne točke odvzeli vzorec Po1. Drugi vzorec, Po2, smo vzeli nižje na pobočju, na občasno poplavljeni lokaciji, z vidnimi sledmi vodnih nanosov detrita.



Slika 7: Sistem Postojnske jame (Zupan Hajna in sod., 2010: 55) in profil Rova koalicije v Spodnjem Tartarusu s prikazanimi mesti vzorčenja v diplomskem delu Zakotnik (2011).

Oznake: 1 – star sediment < 700.000 let, 2 – mlajši sediment ~ 20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti, 4 – sediment na prevojni točki, 5 – razpokan sediment, občasno poplavljenno območje, 6 – sediment z dna občasno poplavljenne struge, 7 – sediment s turistične poti, občasno poplavljenno območje (Zakotnik, 2011).

Vzorčenje: Vzorec Po1 v tej nalogi je bil odvzet iz območja z oznako 1, vzorec Po2 pa iz sedimenta med oznakama 4 in 5.

Preglednica 2: Podatki o vzorcih jamskih sedimentov.

Ime jame	Oznaka vzorcev	n.m.v. (ocen. vrednost)	Vertikalna globina ^a	Barva ^b	Otip / videz / vonj ^c
Velika ledenica v Paradani	P1	1030 m	110 m	10 R 6/12	Lepljiv, gladek / zbit, svetlikajoč / močan, svež
	P2	1010 m	130 m	5 YR 5/8	Drobljiv, suh, statičen /zdrob s kepami-sredica rdeča s črnimi lisami / zatohel
	P3	980 m	155 m	7,5 YR 5/8	Znat / tekoč s peščenimi delci / šibak, zatohel
Križna jama	K1	645 m	55 m	10 YR 7/9	Lepljiv, suh / zdrob z večjimi kepami / močan, zatohel
	K2	644 m	56 m	5 YR 6/8	Lepljiv, suh / zbit, v večjih kepah, rdeče in črne lise v sredici / šibak zatohel
	K3	635 m	65 m	7,5 YR 6/8	Drobljiv, mivkast, suh / zdrob s kepami / srednje zatohel
Rimljanka	V1	500 m	30 m	10 R 6/12	Zelo lepljiv, se trga / zbit v eno kepo / srednje zatohel
Postojnska jama	Po1	545 m	40 m	2,5 YR 6/10	Lepljiv, se trga / svetleč, v gladkih kepah / zelo blag
	Po2	540 m	45 m	5 YR 6/6	Lepljiv, suh, mivkast / zdrob s kepm / srednje zatohel

Oznaka a – ocenjena razdalja med vzorčenim mestom in površjem; b – določeno z Munsell barvnim sistemom (Munsell Soil Color Charts, 1975); c – določeno s pomočjo priročnika (Sandor, 2008).

3.5 ANALIZE FIZIKALNIH IN KEMIJSKIH DEJAVNIKOV OKOLJA

Okolje določa sestavo mikrobne združbe preko biotskih in abiotskih dejavnikov. Ti v različnih habitatih podpirajo le določene vrste metaboličnih reakcij in odnosov med mikrobi.

3.5.1 Aktivna in potencialna kislost (pH)

V injekcijske stekleničke smo v treh ponovitvah odtehtali 10 g sedimenta. Pri določanju aktivne kislosti smo vzorcem dodali 25 ml dH₂O, inkubirali eno uro ter vmes nekajkrat premešali. Pri določanju potencialnih pH vrednosti smo namesto dH₂O vzorcem dodali 25 ml 1 M KCl (Stres, 2007). S pH sondo, umerjeno v nevtralnem območju, smo preko pH metra Orion 520A (Thermo Fisher Scientific, Inc. ZDA) izmerili kislost v vzorcih. Primerjavo med aktivnim in potencialnim pH okolja, smo izrazili z izračunom koncentraciji vodikovih protonov preko logaritemske enačbe ter izračunali razliko med vrednostma za posamezni vzorec:

$$[H^+] = \log 10^{-pH} \quad \dots (2)$$

[H⁺]: koncentracija vodikovih protonov

3.5.2 Vlažnost

Žarilne lončke (Staatlich, KPM Berlin, Nemčija) smo sušili preko noči (p.n.) v termostatski pečici Instrumentaria ST-05 (Instrumentaria, Hrvaška) pri 105 °C. Zabeležili smo težo suhih lončkov, dodali 10 g vlažnega vzorca, v treh ponovitvah ter ponovno sušili pri enakih pogojih. Masni odstotek vode v tleh smo izračunali po enačbi (Suhadolc in sod., 2008):

$$\% w = \frac{m_{H_2O}}{m_{suh.sed}} \times 100 \quad \dots (3)$$

[% w]: masni odstotek vode v vzorcih sedimenta

[m_{H₂O}]: razlika v teži po sušenju vzorcev

[m_{suh.sed}]: masa suhih vzorcev

3.5.3 Zmožnost zadrževanja vode

Odcedne cilindre smo stehali suhe, navlažene ter z dodanim vzorcem (do treh četrtin celotnega volumna cilindra, v treh ponovitvah.). Postavili smo jih pokonci v banjico napolnjeno z navadno vodo do višine sedimenta ter jih pustili namakat čez noč. Naslednji dan smo odlili vodo ter jih odcejali v banjici, podstavljene s hokejskimi steklenimi palčkami. V 20-minutnih presledkih smo merili njihovo težo dokler se le-ta ni ustalila. Maksimalno količino vode, ki jo lahko sprejme in zadrži sediment, smo podali na gram suhega materiala. Ker smo uporabili svež sediment namesto suhega, smo preko izmerjenega odstotka vode v vzorcih preračunali rezultate na gram suhega materiala.

✧ Enačba za izračun teže suhih vzorcev preko podatkov za vlažnost:

$$m_{suh.sed} = \frac{m_{sv.sed}}{1 + w} \quad \dots (4)$$

[w]: masni odstotek vode v vzorcih (vlažnost)

[m_{suh.sed}]: suha teža vzorca sedimenta

[m_{sv.sed}]: masa svežega sedimenta v navlaženem cilindru

✧ Enačba za izračun zadrževanja vode v vzorcih sedimenta (Černigoj, 2009)

$$WHC (100 \%) = \frac{(m_{stab.} - m_{suh.sed})}{m_{suh.sed}} \times 100 \quad \dots (5)$$

[WHC(100 %)]: (angl.: *Water Holding Capacity*) – celokupna masa zadržane vode v tleh

[m_{stab.}]: ustaljena teža odcejenega sedimenta

3.5.4 Vsebnost organske snovi in organskega ogljika

Uporabili smo žarilne lončke s suhim sedimentom iz postopka določanja masnega odstotka vode v vzorcih ter jih pri 500 °C žgali preko noči. Vsebnost skupne organske suhe snovi (OSS) na začetnih 10 g svežega sedimenta, smo določili z izračunom razlike v teži med suhim in žganim sedimentom. To vrednost smo preračunali v vsebnost OSS na gram suhe snovi z uporabo podatkov določanja masnega odstotka vode v sedimentu (Glej 4.4.2).

▲ Enačba za izračun skupne organske suhe snovi na gram suhe mase iz svežega sedimenta (Schumacher, 2002):

$$OSS / g_{suh.sed.} = \left(\frac{m_{suh.sed.} - m_{zg.sed.}}{m_{suh.sed.}} \right) \times \frac{100}{1 + w} \quad \dots (6)$$

[m_{suh.sed.}]: masa suhega vzorca po sušenju 10 g sedimenta na 105 °C preko noči

[m_{zg.sed.}]: masa vzorca po žganju suhega sedimenta na 500 °C preko noči

[w]: masni odstotek vode v vzorcih

Vsebnost skupnega organskega ogljika (g TOC) smo izračunali tako, da smo izmerjene vrednosti OSS (g OSS) delili s konservativnim faktorjem 1.724 (Schumacher, 2002), ki temelji na predpostavki, da organska snov vsebuje 58 % organskega ogljika.

Ker so sedimenti jam oligotrofna okolja, kjer je organskega ogljika v primerjavi s tlemi več velikostnih stopenj manj, smo se odločili določiti vpliv prisotnosti anorganskega ogljika v vzorcih sedimentov jam. Pri meritvah organske suhe snovi smo vpeljali dodatne kontrolne vzorce, s katerimi smo ovrednotili obseg anorganskega ogljika, ki ga zaznamo pri uporabi te tehnike za analize organske snovi. Na sedmih vzorcih kamnin in tal smo izmerili iste parametre kot v zgornjem postopku pri meritvah suhe snovi (SS) in organske suhe snovi (OSS) za vzorce jamskih sedimentov. Vzeli smo štiri vzorce kamnin iz kamnolomov za prikaz razlike v teži na račun anorganskega ogljika v vzorcih; Kamnolom Verd pri Vrhniki, Kamnolom Šmihel pod Nanosom (2x) in Kamnolom Planina pri Rakeku. Za primerjavo rezultatov in kontrolo postopka smo poskus hkrati izvedli še z vzorcem tal na Rodici, uporabljenih za pripravo ekstrakta (Glej 4.6), svežim rečnim sedimentom Ljubljaničice,

vzorčene pri kamnolomu Verd in z vzorcem tal v okolici kamnoloma Šmihel (Slika 3).

3.5.5 Indeks molekulske mase raztopljenе organske snovi

Nekatere biološke spojine so optično aktivne v UV spektru torej lahko spektrofotometrično ocenimo njihovo koncentracijo. Iz razmerja absorpcije proteinov, nukleinskih kislin, sladkorjev pri 250 nm valovne dolžine z ostalimi delci pri 350 nm valovne dolžine, dobimo indeks molekulske mase topne organske snovi (DOM), ki je hkrati merilo za vsebnost raztopljenega organskega ogljika (DOC) (Osburn in sod., 2001).

Metodo smo uporabili po postopku opisanem v članku Bragazza in sod. (2006). Določali smo vsebnost organske snovi v vzorcih sedimenta in v hranilnem ekstraktu, s katerim smo inkubirali vzorce za molekularne analize (glej 4.5).

Iz merilnega valja s suspenzijo sedimenta za določanje teksturnega razreda vzorca, smo po končanem eksperimentu odpipetirali 1 ml suspenzije v 1,5 ml mikrocentrifugirke v treh ponovitvah. Vzorce smo centrifugirali 2 minuti pri 13.000 rpm, prelili supernatant v kivete tipa Hellma 115-QS (Hellma, Nemčija). S spektrofotometrom Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japonska), smo izmerili spekter od 200 nm do 800 nm valovne dolžine, s presledki tiskanja po 5 nm. Za standardizacijo smo pripravili raztopino 0,1 % Na₂CO₃ v dH₂O. Ta koncentracija karbonata je ostanek iz priprave vzorcev za določanje teksture.

▲ Enačba izračuna indeksa molekulske mase raztopljenе organske snovi (Bragazza in sod., 2006):

$$IMM = \frac{A_{365}}{A_{250}} \quad \dots (7)$$

[IMM]: indeks molekulske mase raztopljenе organske snovi

[A₃₆₅/A₂₅₀]: razmerje absorbanc pri 365 nm in 250 nm valovne dolžine

Ker je absorbanca organskih molekul v imenovalcu, smo za lažjo interpretacijo podatkov uporabili obratne vrednosti kvocienta (1/IMM).

3.5.6 Določanje teksturnih razredov jamskih sedimentov s sedimentacijsko metodo

Za zbiranje frakcij smo pripravili 10 ml steklene čaše, štiri na vzorec. Po sušenju (105 °C / p.n.), smo jim določili maso na tri decimalna mesta natančno, s tehtnico Kern Alt 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Nemčija).

V injekcijske stekleničke smo odtehtali 10 gramov vzorca dodali 50 ml 2 % Na₂CO₃ jih zaprli, pomešali ter inkubirali 12 ur pri sobni temperaturi. Sledile so 3 ure stresanja stekleničk s stresalnikom Tehtnica RVI-403 (Tehtnica Železniki, SI) pri 150 obratih na minuto. Po stresanju smo vzorec prelili preko 0,2 mm sita (200 mm Ø x 50 mm ISO 3310/1, Retsch, Nemčija) v litrski merilni valj. Sito smo spirali z dH₂O, dokler ni skozenj pritekla bistra tekočina. Dobljeni ostanek na cedilu smo prenesli v stehtano 10 ml stekleno čašo (prva frakcija – a), v merilni valj pa smo suspenziji dolili dH₂O do 1 litra. Preostale tri frakcije smo dobili preko odvzema 10 ml suspenzije na globini 10 cm od gladine, ob točno določenem času sedimentacije delcev. V ta namen smo 10 ml stekleno pipeto označili na dolžini 10 cm od spodnjega konca. Valj s suspenzijo smo zatesnili, premešali ter odvezemali frakcije po spodnjem protokolu:

- ⤴ 3 minute mešanja, 44 sekund sedimentacije – odvzem druge frakcije (b)
- ⤴ 3 minute mešanja, 4 minute, 27 sekund sedimentacije – odvzem tretje frakcije (c)
- ⤴ 3 minute mešanja, 7 ur, 35 minut sedimentacije – odvzem četrte frakcije (d)

Odvzetih 10 ml suspenzije smo prenesli v preostale tri steklene čaše ter vse štiri frakcije na vzorec in sušili (105 °C/ p.n.). Suhe frakcije smo stehtali na tri decimalna mesta natančno ter izračunali deleže posamičnih komponent, teksturnih razredov po enačbah (Stres, 2007):

$$\%PG = (a/100) \times 100 \quad \dots (8)$$

[PG]: peščena glina,

$$\%G = ((d - 0,01) / 0,1) \times 100 \quad \dots (9)$$

[G]: glina,

$$\%FM = ((c - d) / 0,1) \times 100 \quad \dots (10)$$

[FM]: fin melj

$$\%GM = ((b - c) / 0,1) \times 100 \quad \dots (11)$$

[GM]: grob melj

$$\%FP = 100 - (\%GP) - (\%GM) - (\%FM) - (\%G) \quad \dots (12)$$

[FP]: fin pesek

$$\%P = (\%GP + \%FP) \quad \dots (13)$$

[P]: pesek

$$\%M = (\%FM + \%GM) \quad \dots (14)$$

[M]: melj

*a, b, c, d: masa suhih frakcij.

3.5.7 Določanje poroznosti vzorcev sedimenta

Trem 20 ml siringam smo odrezali dno in odmerili 10 ml sedimenta [V_s], v treh ponovitvah. Vzorce smo prenesli v posušene in stehtane žarilne lončke, zabeležili maso [$m_{sv.sed.}$] ter jih posušili (105 °C/ p.n.). Po meritvi mase suhih vzorcev [$m_{suh.sed.}$], smo suh sediment potopili v merilni valj napolnjen z navadno vodo. Razlika v dvigu gladine predstavlja volumen trdih delcev [V_t]. Zaradi uredbenih omejitev pri vzorčenju Postojnske jame, smo imeli premalo sedimenta za izvedbo eksperimenta po navodilih. Tako smo pri vzorcu Po2 namesto 10 ml odvzeli samo 5 ml, izvedba poskusa za Po1 pa ni bila več mogoča.

Poroznost sedimenta [Φ] smo izračunali iz razmerja med gostoto sedimenta [Db] in gostoto

delcev v sedimentu [Dp]:

▲ Enačba za izračun gostote sedimenta in gostote delcev:

$$Db = \frac{m_{suh.sed}}{V_s} \quad ter \quad Dp = \frac{m_{suh.sed}}{V_t} \quad \dots (15)$$

[Db] : gostota sedimenta

[Dp]: gostota delcev

[m_{suh. sed}]: teža suhega vzorca

[V_s]: prostornina svežega vzorca (10 ml)

[V_t]: prostornina trdnih delcev

▲ Poroznost sedimenta (Miller in Donaue, 1990, cit. po Zakotnik, 2011):

$$\Phi = 1 - \frac{Db}{Dp} \quad \dots (16)$$

[Φ]: poroznost

[Db] : gostota sedimenta

[Dp]: gostota delcev

3.5.8 Primerjava fizikalno – kemijskih parametrov jamskih sedimentov s podatki vzorcev tal

Godicelj (2011) je sestavil večje število prekrivajočih se setov podatkov o fizikalno-kemijskih lastnostih tal iz svojega dela in pregleda literature. Podatkovno zbirko s 70 vzorci za različna tla po svetu smo razširili s 5 vzorci iz člankov, 14 vzorci neobjavljenih študij (Stres in sod., 2002; Blažič in sod., 2009) in devet naših vzorcev jamskega sedimenta. S statističnim programskim orodjem PAST (Hammer in sod., 2001) smo želeli oceniti, v kolikšni meri lastnosti skupine jamskih sedimentov odstopajo od lastnosti različnih tipov površinskih tal. Uporabili smo lahko le prekrivajoče se sete podatkov, tiste, ki so bili izmerjeni za vse vzorce (Priloga A). Za dejavnike okolja so bili izbrane vrednosti pH, odstotka gline, melja in peska ter vsebnosti organskega ogljika. Podatke smo uvozili v

program v .txt formatu in jih razvrstili v skupine glede na tip tal. Po standardizaciji smo za prikaz medsebojnih odnosov uporabili ordinacijo NM MDS ordinacijo (Non-metric Multi Dimensional Scaling), z Bray Curtis indeksom za pretvorbo spremenljivk v distančno matriko. Razpršenost podatkov smo prikazali opisom razpršitve 95 % podatkov znotraj posamezne skupine. Analizo smo najprej izvedli za vse zbrane vzorce, nato še posebej za primerjavo vzorcev tal iz Slovenije in naših jamskih sedimentov.

3.6 MOLEKULARNE ANALIZE JAMSKIH SEDIMENTOV

3.6.1 Izolacija DNA

Celokupno DNA v vzorcih smo izolirali s kompletom UltraClean Soil Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc. ZDA). Zamrznjen sediment smo s sterilno injekcijsko iglo (TIK d.o.o., Slovenija) prenesli na vialo kita ter nadaljevali po navodilih proizvajalca uporabljenega kompleta. Izolirano DNA smo shranjevali pri -20 °C.

Dodatno smo v analizah DNA uporabili (i) vzorce tal, za pozitivno kontrolo in za pripravo hladnih talnih ekstraktov za inkubacijski eksperiment, in (ii) steklene kroglice, inkubirane s talnim ekstraktom, za kontrolo v inkubacijskem eksperimentu.

3.6.2 Pomnoževanje odsekov gena DNA, ki kodira 16S rRNA, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

V naši raziskavi smo uporabili dva para široko specifičnih začetnih oligonukleotidov za bakterije:

▲ 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Pace in sod., 2000) in

518R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3' (Muyzer in sod., 1993)

Dolžina pomnožkov je okoli 500 bp. Uporabili smo jih pri pripravi pomnožkov za LH PCR in T-RFLP metodi tipizacije.

▲ 27f in 926R: 5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT-3' (Nybroe in sod., 2003)

Dolžina pomnožkov je okoli 1000 bp. Uporabili smo jih v začetnih pomnoževanjih, nato zamenjali za prvi oligonukleotidni par.

Količine reagentov v reakcijski mešanici za 25 µl alikvote smo izračunali s programom PCR Calculator (Biometra, 2003).

Vsa pomnoževanja v tej raziskavi so potekala po enakem protokolu, kot je navedeno v preglednici spodaj, z aparatom MyCycler™ (BIO-RAD Laboratories, Inc. ZDA). Produkta smo hranili pri 4 °C.

Preglednica 3: Protokol pomnoževanja gena za 16S rRNA z reakcijo PCR

Vrsta cikla	Čas	Temperatura	Število ciklov
Predcikel	5 min	94 °C	1
Denaturacija DNK	30 s	94 °C	30
Prileganje zač. oligonuk.	30 s	57 °C	
Podaljševanje verige	1 min	52 °C	
Podaljšana polimerizacija	7 min	72 °C	1
Zaustavitev, ohranjanje	∞	4 °C	/

3.6.3 Gelska elektroforeza

Pripravili smo 1 % agarozni gel v 0,5x TBE pufu. Nanašali smo 1 µl 1 kb DNA lestvice GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA) ter 5 µl vzorca, resuspendiranega v 3 µl nalagalnega pufu. Elektroforeza je tekla 25 minut pri 100 mV in 400 A. Sledilo je 10 minut namakanja gela v etidijevem bromidu [EtBr], ki se

vkluči v vijačnico DNA, nato 10 minut razbarvanja v dH₂O. V komori z UV-transiluminatorjem smo vzpodbudili fluoresciranje etidijevega bromida ter z optimizacijo obsevanja izboljšali ločljivost slike.

3.6.4 Redčenje izolirane DNA

Za optimizacijo postopka pridobivanja molekularnega signala iz vzorcev hranilno revnih sedimentov, smo nastavili reakcijo PCR z razredčitvami celokupne izolirane DNA. Izbrali smo DNA iz vzorcev sedimenta, pripravili 10-krat in 100-krat razredčitve v vodi za molekularne analize (Sigma-Aldrich, Nemčija). Za končni volumen 50 µl 10-krat ali 100-krat razredčene suspenzije, smo v 45 µl sterilne Sigma vode (Sigma-Aldrich, Nemčija) dodali 5 µl izolirane DNA ali 10-krat zredčene DNA. Pri direktnem redčenju za faktor 2, pa smo v 49,5 µl sterilne Sigma vode dodali 0,5 µl nerazredčene DNA.

3.7 SIMULACIJA SPOMLADANSKEGA VNOSA HRANIL - INKUBACIJA VZORCEV JAMSKIH SEDIMENTOV Z EKSTRAKTOM HRANIL IZ TAL

Ob spomladanski talitvi zamrznjenega površja se s presežkom vod v podzemlje izpirajo tudi snovi iz sveže odtaljenih tal. Zanimal nas je odziv mikrobne populacije v jamskem sedimentu na dodana hranila in vodo.

V ta namen smo pripravili kontroliran inkubacijski eksperiment, kjer smo jamskim sedimentom dodali hladni talni ekstrakt. Za analize molekularnega signala samega ekstrakta, smo inkubacijo izvedli s sterilnim steklenim kroglicam, premera 2 mm z ekstraktom, brez sedimenta. Vse vzorce smo inkubirali štiri tedne pri 6 °C. Iz vzorca travniških tal, ki smo ga uporabili za pripravo ekstrakta, smo izolirali DNA. Ta je služila kot pozitivna kontrola pri nadaljnjih molekularnih analizah, s katerimi smo ocenili odziv mikrobnih združb pred in po inkubaciji. S pomnoževanjem gena male ribosomske

podenote, 16S rRNA, z reakcijo PCR smo ocenili količino bakterijske biomase. S tipizacijo bakterijskih združb s tehnikama LH PCR in TRFLP smo primerjali (i) začetno stanje pred in končno stanje po inkubaciji z ekstraktom, (ii) združbo v sedimentih in tleh, (iii) sedimente in združbe iz ekstrakta tal (iv) tla in združbe iz ekstrakta tal.

3.7.1 Priprava ekstrakta

Za pripravo ekstrakta smo uporabili travniška tla v bližini stavbe oddelka Biotehniške fakultete za Zootehniko, na Rodici. Z lopato smo odvzeli okoli 15 x 15 x 5 cm³ veliko sredico, jo razdelili v dve 5 litrski vreči ter ju napolnili z vodo do skupno 2 litra, pretresli in zamrznili pri -20 °C. Vreči smo v naslednjih treh dneh vsak dan odtalili, pretresli in ponovno zamrznili. Po tretji odtalitvi smo nastalo gosto suspenzijo tal zbrali v čaši. Alikvote ekstrakta smo razdelili po 50 ml v plastične epruvete z zamaškom (BD Falcon™ BD Bioscience, ZDA) in zamrznili pri -25 °C do uporabe v eksperimentih.

3.7.2 Inkubacija vzorcev

Ob gorilniku smo v 50 ml sterilne plastične epruvete (BD Falcon™) istega proizvajalca aseptično prenesli do 5 g vzorca v treh ponovitvah. Kot kontrolo rasti smo v ločene epruvete dali enako maso steklenih kroglic, steriliziranih v avtoklavu A-21CA (Kambič, Slovenija). Do dodajanja ekstraktov smo vse pripravljene mikrokozme shranili pri 4 °C.

Ekstrakte smo odtalili, pretresli in centrifugirali 10 min pri 3300 rpm. Ostanke plavajočih delcev, detrita, smo odstranili na 0,2 mm situ (Retsch, Nemčija). Pripravljen supernatant smo v alikvotih po 5 ml aseptično dodali vzorcem in steklenim kroglicam. Inkubacija je potekala štiri tedne pri 6 °C v temi.

3.7.3 Odstranjevanje ekstrakta in priprava za molekularne analize

Po končani inkubaciji smo po 0,5 g inkubiranega sedimenta oziroma 5 steklenih kroglic negativne kontrole razdelili v mikrocentrifugirke. Na posamezni vzorec smo tako za molekularne analize pripravili od 7 do 10 mikrocentrifugirk, ki smo jih označili z imenom vzorca in številom ponovitve inkubacije. Po eni minuti centrifugiranja pri 13.000 rpm smo z avtomatsko pipeto odstranili višek tekočine ekstrakta in vzorce peleta shranili pri -25 °C. Za vsako od treh ponovitev inkubacije smo izolirali DNA, pomnožili gen za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo ter analizirali rezultate z gelsko elektroforezo, po opisanem postopku v prejšnjem poglavju (Glej 3.6).

3.7.4 Fizikalno kemijske analize ekstrakta

Za določanje hranilne vsebnosti smo tri ponovitve vzorcev ekstrakta centrifugirali 1 min pri 13.000 rpm ter izmerili IMM – indeks molekulske mase raztopljenih organskih snovi (glej 4.4.5). Določili smo organsko suho snov (OSS), pH, vsebnost skupnega dušika (S-N) in amonijskega dušika (NH_4^+) po protokolih Sabine Kolbl (Doktorska disertacija v pripravi, FGG).

3.8 TIPIZACIJA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V JAMSKIH SEDIMENTIH

Kljub visoki evolucijski ohranjenosti gena, ki nosi zapis za malo ribosomsko podenoto, obstajajo odstopanja v nukleinskem zaporedju med posameznim taksonomskim enotam v bakterijski populaciji. Pri zaznavanju teh razlik, v analizah strukture mikrobnih združb v okoljskih vzorcih, se poslužujemo različnih metod, s katerimi preko manipulacije produktov pomnoženega gena za 16S rRNA primerjamo profile združb med vzorci na

podlagi njihove podobnosti, vendar brez filogenetske in kvantitativne informacije (Stres, 2006).

Izbrani tehniki za tipizacijo bakterijskih združb v tej študiji, LH PCR in TRFLP, sta bili uporabljeni pri študiji Postojnske jame v diplomskem delu Zakotnik (2011) ter pri analizi travniških tal v diplomskem delu Godicelj (2011), kjer sta tudi podrobneje opisani.

3.8.1 Bioinformatika analiza potencialnih fragmentov tehnik LH PCR in TRFLP z izbranimi začetnimi oligonukleotidi in restrikcijskimi encimi

Analizirali smo ločljivost uporabljenih tipizacijskih tehnik glede na omejitve standardiziranega postopka analize produktov s kapilarno elektroforezo ABI 3130XL (Life technologies, Applied Biosystems, ZDA) z internim standardom GeneScan™ -500 ROX istega proizvajalca.

Iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009) smo pridobili 166.945 sekvenc gena za 16S rRNA od mesta 8f do 1391R, torej skoraj v celotnem razponu gena (>90 %). Nabor je vseboval sekvence sevov in sekvence pridobljene direktno iz okolja. Za analizo smo uporabili program BEstRF (Stres in sod., 2009) s katerim smo določili število sekvenc, ki jih izbrana para začetnih oligonukleotidov prepoznata. Za karakterizacijo dolžinske heterogenosti smo uporabili oba para začetnih oligonukleotidov v tej študiji (Glej 3.6.2) in določili nastalo število različnih dolžinskih fragmentov po prepoznavanju sekvenc iz podatkovne baze. Za izvedbo tehnike T-RFLP smo izbrali restrikcijsko endonukleazo, ki je dobljene pomnožke razrezala na največje število restrikcijskih fragmentov (TRF), ki so med sabo ločljivi. Encim smo izbrali, v kolikor je bilo več kot 90 % celotnega signala združbe zajetega v fragmentih do 530 bp, kar je zgornja meja natančnega določanja velikosti fragmentov na kapilarni elektroforezi ob uporabi izbranega internega standarda (Kitts, 2001).

3.8.2 Priprava vzorcev za tipizacijo bakterijskih združb z metodama LH PCR in TRFLP

Vzorci sedimenta, iz katerih smo izolirali DNA pred inkubacijo z ekstraktom tal, smo označili s pripisom -0 za oznako vzorca. Vzorce z izolirano DNA po dodatku ekstrakta, smo označili glede na število ponovitve inkubacije s pripisom -1, -2, in -3. Skupno smo imeli 9 vzorcev sedimenta pred inkubacijo, 27 vzorcev sedimenta po inkubaciji ter 3 ponovitve inkubacije talnega ekstrakta s sterilnimi steklenimi kroglicami, ki smo jih označili z "neg". Za nadaljnje delo smo pripravili 100-krat razredčene suspenzije vseh 39 izolatov DNA. Za pozitivno kontrolo in primerjavo strukture združbe, smo v treh ponovitvah pripravili 100-krat razredčeno DNA, izolirano iz vzorca tal, ki smo ga uporabili za pripravo ekstrakta hranil (oznaka Z1, 2, in 3 na dendrogramih).

3.8.3 Analiza raznolikosti v dolžini pomnoženega gena za 16S rRNA (LH PCR)

DNA vseh 42 izolatov smo 100-krat zredčili in za negativno kontrolo reakcije PCR uporabili vodo Sigma S (Sigma-Aldrich, Nemčija), s katero smo razredčitve izvedli. Pomnoževanje gena za 16S rRNA je potekalo s parom začetnih oligonukleotidov 27f in 518R, prvi je bil označen na 5' koncu s fluorokromom 6-FAM (6-karboksifluorescein). Reakcijo smo izvedli v treh ponovitvah ter pomnožke združili. Za vsako ponovitev smo preverili rezultate z elektroforezo na 1 % agaroznem gelu. Združene produkte smo očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija) po priloženih navodilih. Na mikrotitrsko ploščico smo naložili po 5 µl očiščenega produkta ter jih ločili na sekvenatorju ABI 3130XL (Life technologies; Applied Biosystems, ZDA). Pri uporabljenem paru začetnih oligonukleotidov smo pričakovali okoli 500 bp dolg pomnožek. Za natančno primerjavo variabilnosti dolžine gena smo uporabili interni standard GeneScan™ -500 ROX (Life technologies; Applied Biosystems, ZDA). Rezultate smo analizirali s programom BioNumerics 5.0 (Applied Maths, ZDA). Pri nekaterih

vzorcih je prevelika količina produkta onemogočala natančno analizo, zato smo kapilarno elektroforezo ponovili; vzorce s prevelikim šumom smo pripravili v mešanici po 2 μ l 100-krat razredčene matrice s 3 μ l vode Sigma S.

3.8.4 Analiza polimorfizma dolžin končnih fragmentov restrikcije gena za 16S rRNA (TRFLP)

Pomnoževanje, začetne analize pomnožkov ter čiščenje smo izvedli na identičen način kot za LH-PCR (Glej 3.8.3). Koncentracijo pomnožene DNA v restrikcijski mešanici smo določili s programom Genetools (Syngene, VB). Ta določi vsebnost DNA v vzorcu na podlagi primerjave intenzitete sevanja pasov na sliki gelske elektroforeze s standardom znane koncentracije DNA. Preračunali smo delež genetskega materiala v posamičnih pasovih uporabljene 1 kb DNA lestvice. Najbolje vidni pas lestvice smo označili za standard ter mu pripisali izračunano koncentracijo. Preko dobljenih rezultatov primerjave smo določili razmerje med pomnožki naših vzorcev in vodo Sigma S (Sigma-Aldrich, Nemčija) v restrikcijski mešanici (skupni volumen 25,5 μ l), ki smo ji dodali še 1,5 μ l restrikcijskega endonukleaznega encima *BsuRI* (*HaeIII*: 5' GG↓CC 3') v 3 μ l ustreznega pufra (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). Pripravljeno 30 μ l restrikcijsko mešanico smo 14 ur inkubirali v zaprti vodni kopeli WB-30 (Kambič, Slovenija) pri 37 °C, nato zaustavili restrikcijo z 20 minutno inkubacijo pri 80 °C v temi. Mešanico smo očistili z enakim kompletom kot produkte PCR, po navodilih proizvajalca. Ločevanje končnih restrikcijskih fragmentov je potekalo na kapilarni elektroforezi za določanje zaporedij DNA, ABI 3130XL (Life technologies, Applied Biosystems, ZDA) z internim standardom GeneScan™ -500 ROX istega proizvajalca. Rezultate smo analizirali s programom BioNumerics 5.0 (Applied Maths, ZDA).

3.8.5 Analiza rezultatov tipizacijskih tehnik LH PCR in TRFLP

Rezultate kapilarne elektroforeze za obe metodi smo obdelali s programom BioNumerics 5.0 (Applied Maths, ZDA). Predstavili smo jih z izrisom dendrogramov, z enotno nastavitvijo parametrov. Profil bakterijske združbe smo prikazali za vzorce v začetnem in končnem stanju inkubacije s telnim ekstraktom ter ločeno samo za vzorce v začetnem stanju, pred inkubacijo. Uporabili smo Pearsonov koeficient korelacije za kvantifikacijo razdalj med izmerjeno vrednostjo in standardom ter uvrstili vzorce v skupine z neobteženo metodo parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA). Dolžina veje in odstotki razvejišč predstavljajo mero podobnosti med podatki. Vzorce smo z uporabo aplikacije *cut off value* razdelili v homologne skupine, ki so ločeni med seboj z vejami svetlo sive barve. Zaradi velikega odstopanja v količini genetskega materiala v posameznih vzorcih, smo določili 10 % mero optimizacije in pozicijske tolerance. Vzorci sedimenta pred dodatkom ekstrakta, so označeni s pripisom -0 za oznako vzorca, vzorci inkubiranega sedimenta pa glede na število ponovitve inkubacije, s pripisom -1, -2 in -3 (npr.: K1-2 je druga ponovitev inkubiranega vzorca K1).

4 REZULTATI

4.1 ANALIZE DEJAVNIKOV OKOLJA

Prikaz skupnih rezultatov vseh merjenih fizikalno-kemijskih parametrov (Pregl. 4), razen teksturne porazdelitve razredov, ki je v ločenem podpoglavju (Pregl. 6).

Preglednica 4: Fizikalni in kemijski parametri za vzorce jamskih sedimentov.

Vzorec	pH akt.	pH poten.	% w	% WHC	% Por.	IMM	% OSS	% TOC
P1	7,77±0,01	7,10±0,17	37,62±1,10	45,22±2,74	31,00±1,73	0,39±0,00	1,60±0,07	0,93±0,04
P2	7,85±0,02	6,85±0,04	23,46±0,00	46,25±1,79	41,67±2,89	0,28±0,00	1,40±0,10	0,81±0,06
P3	7,87±0,08	7,23±0,04	51,52±0,00	47,30±0,43	35,00±5,00	0,33±0,00	0,75±0,06	0,44±0,03
K1	7,78±0,03	6,91±0,18	37,00±1,88	50,64±1,02	33,33±2,89	0,22±0,00	0,46±0,17	0,27±0,10
K2	7,81±0,17	6,82±0,20	29,89±1,69	36,68±3,69	38,67±6,03	0,29±0,00	0,54±0,05	0,31±0,03
K3	7,94±0,17	7,23±0,06	20,97±0,85	24,57±1,20	18,33±2,89	0,28±0,00	0,26±0,06	0,15±0,03
V1	7,75±0,09	7,01±0,06	31,59±1,73	38,26±2,63	26,67±5,77	0,35±0,00	0,70±0,04	0,40±0,02
Po1	8,38±0,49	7,02±0,19	37,00±1,88	43,71±2,22	np*	0,36±0,02	0,49±0,04	0,28±0,02
Po2	8,46±0,16	6,94±0,25	33,38±3,04	46,38±4,47	23,33±5,77	0,27±0,01	0,22±0,07	0,13±0,04

*np – ni podatka; pri vzorcu Po1 nam je zmanjkalo vzorčenega sedimenta za merjenje poroznosti.

Vzorci: P(1,2,3) – Paradana, K(1,2,3) – Križna jama, V1 – Rimljanka, Po(1,2) – Postojnska jama.

Parametri: pH.akt – aktivni pH okolja, pH pot. – potencialni pH okolja, % w – masni odstotek vode, % WHC – sposobnost zadrževanja vode, % Por. – odstotek poroznosti materiala, IMM – indeks molekulske mase DOM (raztopljene oranske snovi), % OSS – odstotek organske suhe snovi v vzorcih, % TOC – odstotek skupnega organskega ogljika v vzorcih.

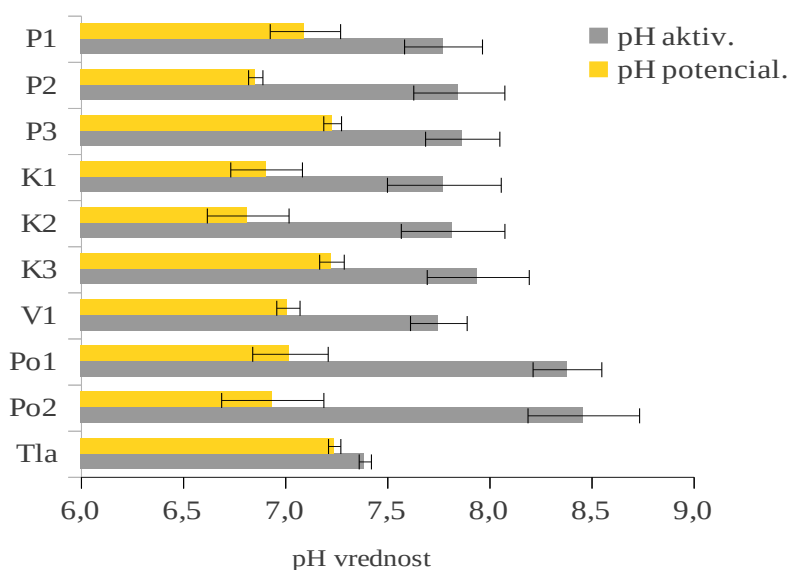
Standardni odklon (±) je preračunan iz izvedbe eksperimentov v treh ponovitvah.

Obrazložitve in grafični prikazi rezultatov posameznih meritev so v sledečih podpoglavjih.

4.1.1 Kislost vzorcev – pH

Na spodnji sliki (Sl. 8) so grafično predstavljene meritve pH, ki so zbrane v Pregl. 4 na začetku poglavja. Rezultate meritev aktivne in pasivne kislosti jamskih sedimentov smo primerjali s podatki o vzorcu tal iz diplomskega dela Godicelj (2011).

Odstopanja pri meritvah pH vzorcev jamskega sedimenta so majhna, z razponom 0,71 pH pri aktivnem in 0,41 pri pasivnem pH. V primerjavi z rezultatom meritve pH vzorca tal v diplomskem delu Godiclja (2011), ki je bila opravljena z enakim postopkom, vzorci jamskih sedimentov ne kažejo odstopanja od površinskih tal.



Slika 8: Aktivne in potencialne vrednosti pH vzorca površinskih tal (Godicelj, 2011) in vzorcev jamskih sedimentov.

Od jamskih okolij je najbolj bazični sediment v vzorcih iz Postojnske jame, kjer smo namerili aktivni pH 8,46 pri vzorcu Po2, najbolj kisel sediment pa smo vzorčili v Rimljanki z vrednostjo 7,75 aktivnega pH (vzorec V1).

V spodnji preglednici je prikazana razlika med aktivnim in pasivnim pH, izražena v koncentraciji vodikovega protona. Padec pH pri pasivni kislosti zabeležimo na račun dodanega KCl suspenziji jamskih vzorcev in vzorcu tal (Pregl. 5). Pri vseh meritvah jamskih vzorcev smo ob dodatku K^+ kationa zabeležili porast vodikovega protona, ki je v primerjavi s podatki o vzorcu tal znatno večji. Koncentracija vodikovega protona v vzorcih sedimenta se vsaj dvakrat (vzorec P3) do osemkrat (vzorec K2) bolj poveča kot v vzorcu tal, kjer smo zabeležili padec pH le za 0,15 enote.

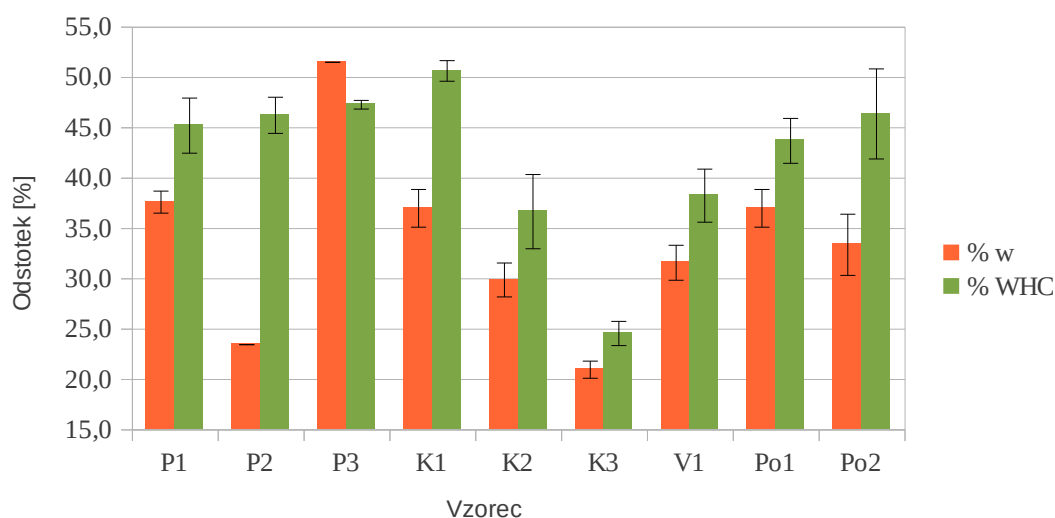
Preglednica 5: Izračun razlike v koncentraciji vodikovih protonov $[H]$ med aktivno in potencialno vrednostjo pH po enačbi (2), za vzorce jamskih sedimentov in za podatke vzorca površinskih tal (Godicelj, 2011).

Vzorec	$[H^+] 10^{-8} M$
P1	6,23
P2	12,60
P3	4,53
K1	10,73
K2	13,74
K3	4,79
V1	7,92
Po1	9,06
Po2	11,22
Tla	1,68

Ob izmenjavi vodikovega kationa s kalijevim opazimo največji porast prostih vodikovih protonov pri vzorcu K2, nato P2, Po2, K1, Po1, V1, P1, K3 in najmanj pri vzorcu P3.

4.1.2 Voda v vzorcih

Razpoložljivost vode v štirih jamskih okoljih smo analizirali z določanjem masnega odstotka vode na dan vzorčenja (% w) in zadrževalne kapacitete vode (% WHC) pri vzorcih jamskega sedimenta. Rezultati so prikazani na spodnji sliki (Sl. 9) in v skupni tabeli na začetku poglavja (Pregl. 4).



Slika 9: Masni odstotek vode (% w) na dan vzorčenja in sposobnosti zadrževanja vode (% WHC) v vzorcih jamskih sedimentov.

Pri meritvah WHC je voda odtekala zelo počasi iz vseh vzorcev. Opravili smo najmanj 13 meritev (vzorec V1) v intervalih odcejanja po 20 minut (260 min). Vzorce iz Križne jame smo morali pustiti preko noči ter zabeležili padec v teži vode tudi naslednji dan. Vzorec P3 iz Paradane pa smo odcejali tri dni, masa odcednega cilindra se je ustalila šele pri 26. meritvi.

Največjo kapaciteto zadrževanja vode je imel vzorec K1 s 50,7 % WHC. Največ vode na dan vzorčenja smo pri 51,5 % namerili v vzorcu P3 in je za 4,2 % presegla zadrževalno kapaciteto sedimenta. V vzorcu K3 smo dobili najmanjši vrednosti obeh parametrov s 24,6 % WHC in 21 % vlažnostjo. Pri vzorcu P2 je bila vlažnost v sedimentu na dan

vzorčenja za polovico manjša od sposobnosti zadrževanja vode, razlika je merila 22,8 %.

Pri vzorcih iz Paradane (P1, P2, P3) so bila kljub skoraj enaki zadrževalni kapaciteti zelo različna odstopanja v vsebnosti vode. Vzorec P3 je imel presežek vode v sedimentu, vzorec P2 največjo razliko med vrednostma, vzorec P1 pa je imel razmerje med količinama primerljivo z rezultati iz drugih jam, kjer je bila vlažnost na dan vzorčenja okoli 1/5 manjša od maksimalne količine vode, ki jo sediment lahko zadrži (Sl. 9).

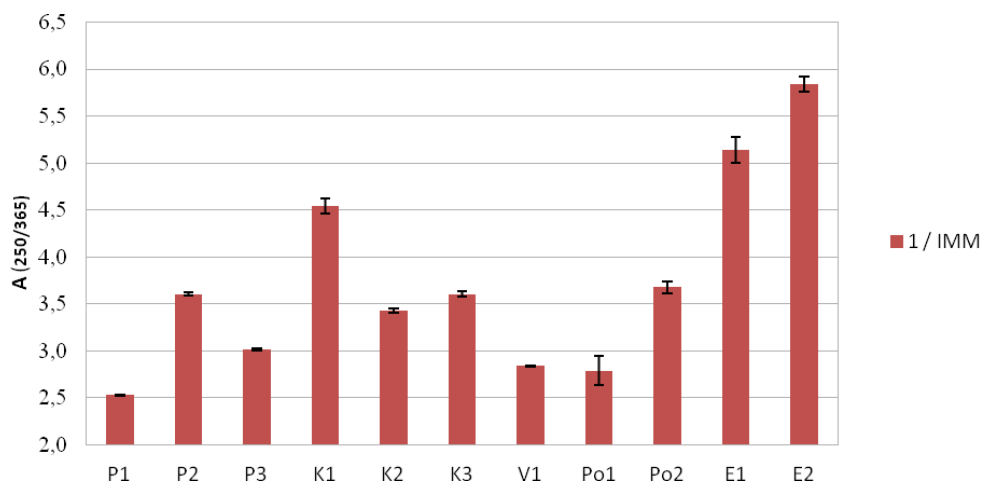
Medtem ko sposobnost zadrževanja vode ne variira bistveno pri vzorcih iz Paradane, smo v vzorcih sedimenta Križne jame namerili največjo (K1) in najmanjšo (K3) vrednost WHC od vseh jamskih vzorcev, s 25 % razliko rezultata.

Vrednosti za parametra pri vzorcu V1, iz novo odkrite jame Rimljanke, sta se uvrstili v povprečje med vsemi jamami ter najbližje rezultatom sedimentnega vzorca K2.

Pri vzorcih iz Postojnske jame je imel vzorec Po2 večjo zadrževalno kapaciteto, vendar manjšo vlažnost sedimenta na dan vzorčenja kot vzorec Po1. Razlika v vrednosti WHC med vzorcema je merila le 3 %, standardni odklon od povprečja treh meritev pri vzorcu Po2 pa je znašal 5 %. Ker je bila napaka meritev večja od same razlike med rezultatoma težko zanesljivo trdimo, da ima sediment vzorca Po2 boljšo zadrževalno sposobnost vode kot vzorec sedimenta Po1.

4.1.3 Indeks molekulske mase raztopljenih organskih snovi

Z merjenjem koeficienta absorpcije v suspenziji vzorcev sedimenta in tal (E1, E2) smo določili velikost oz. kompleksnost topne organske snovi. Ker je dobljeni indeks molekulske mase (IMM) obratno sorazmeren z velikostjo molekul, smo za spodnji grafični prikaz (Slika 10) uporabili recipročne vrednosti rezultatov.



Slika 10: Raztopljen organski snov v vzorcih sedimenta in ekstrakta travniških tal (E1, E2), izražena z recipročno vrednostjo indeksa molekulske mase (1/IMM) glede na kvocient absorbanse suspenzije vzorcev pri valovni dolžini 250 nm in 365 nm.

Od vseh vzorčenih jam je bila molekulska masa organske snovi največja v sedimentu Medvedjega rova v Križni jami, s 3,9 povprečne vrednosti 1/IMM v vzorcih K1, K2 in K3 (Slika 10). Najvišja vrednost recipročnega indeksa je bila 4,5 v vzorcu K1, kar pomeni da je organska snov v sedimentu iz vrha Hochstetterjeve ploščadi najbolj kompleksna od vseh devetih vzorčenih mest. V vzorcu K2, ki smo ga odvzeli meter nižje v sedimentnem skladu točno pod njim, se je molekulska masa organske snovi zmanjšala za skoraj $\frac{1}{4}$, torej je snov razpadla v enostavnejše molekule. Podobno razmerje smo dobili pri vzorcih Postojnske jame. Molekulska masa organske snovi vzorca Po1 iz sredine sedimentnega sklada je bila za $\frac{1}{4}$ manjša od vzorca iz poplavnega pobočja (Po2), kar kaže na vpliv rečnega sistema in da z globino sedimentnega sklada organska snov razpade na enostavnejše molekule, saj so globlji sloji starejši. Kljub rednemu doprinosu aluvija v sediment vzorca Po2, pa je bila po naših podatkih organska snov v sedimentih Medvedjega rova bolj ali enako kompleksna. Najbolj enostavne topne organske molekule so bile v vzorcu P1 iz ledenice v Paradani, s 44 % nižjo vrednostjo recipročnega indeksa od vzorca K1. Sledil mu je vzorec Po1, nato V1 iz Rimljanke in P3 iz Paradane.

Vzorci P2, K3 in Po2 imajo skoraj enake vrednosti indeksa organskih snovi, ki se gibljejo malo nad povprečjem vrednosti 1/IMM jamskih vzorcev, ki znaša 3,3. V vzorcu P2 smo

sumili na vsebnost hranil zaradi črnkaste barve sedimenta, iz katerega smo vzorčili. Po kompleksnosti organskih snovi se ta vzorec iz ledeniške jame primerja z vzorci sedimenta Križne jame (K2, K3) in vzorcem iz poplavnega območja v Postojnski jami (Po2).

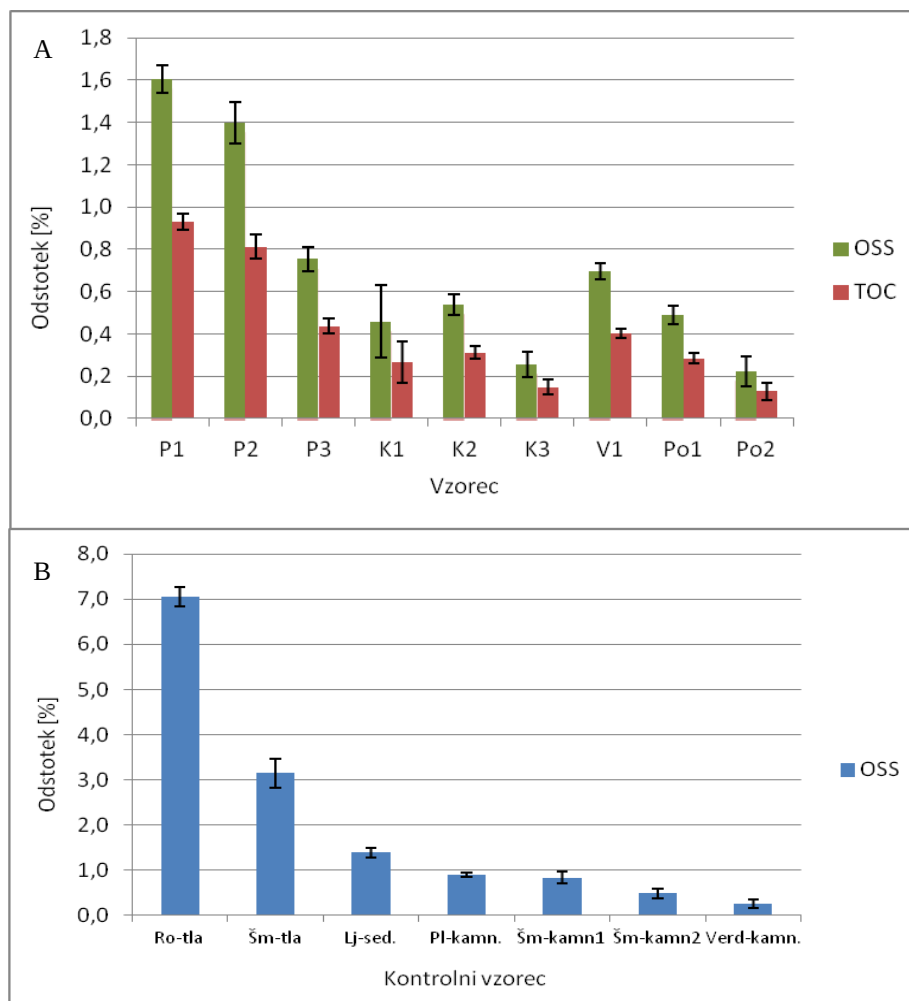
Vzorca E1 in E2 sta ponovitvi analize talnega ekstrakta, s katerim smo inkubirali vzorce sedimenta za molekularni eksperiment (Glej 4.6). Organska snov v vodnem ekstraktu tal je bila bolj kompleksna kot v jamskih sedimentih, namerili smo 5,49 povprečnega recipročnega indeksa s 5,1 pri E1 in 5,8 pri E2 alikvotu ekstrakta. Razlika med povprečno vrednostjo vseh jamskih vzorcev in povprečjem eksudatov je bila 36 %, najmanjša razlika med jamskim sedimentom in vzorcem tal je merila samo 0,6 ali 10 % vrednosti 1/IMM med vzorcema K1 in E1

4.1.4 Meritve organskega ogljika

Na Sliki 11 so prikazani rezultati iz Preglednice 4, za meritve organske suhe snovi (OSS) in izračun organskega ogljika (TOC) v vzorcih jamskega sedimenta.

Pri meritvah organske suhe snovi s sežigom vzorcev smo vpeljali dodatne kontrolne vzorce kamnin, rečnega sedimenta in tal (Sl. 11-B), s katerimi smo ovrednotili obseg anorganskega ogljika, ki ga zaznamo pri uporabi te tehnike.

Vzorci kamnin, so po žarenju izgubili med 0.26 % (kamnolom Verd) do 0.9 % teže (kamnolom Planina) na račun anorganskega ogljika, kar bi sicer pripisali organski snovi (Sl. 11-B). Vzorca tal iz Rodice, ki smo jih uporabili kot vir hladnega ekstrakta in tla ob kamnolomu Šmihel sta vsebovala 7 % in 3,1 % OSS, rečni sediment Ljubljanice pa 1,4 % suhe organske snovi.



Slika 11: Vsebnosti organske suhe snovi (OSS) in skupnega organskega ogljika (TOC) v vzorcih jamskega sedimenta (A) in analiza anorganskega ogljika s kontrolnimi vzorci tal, sedimenta in kamnin (B).

Oznake kontrolnih vzorcev: **Ro-tla** – tla za pripravo ekstrakta hranil, Rodica **Šm-tla** – tla pri kamnolomu Šmihel, **Lj-sed.** – sveži rečni sediment iz Ljubljane, **Pl-kamn.** – vzorec kamnoloma Planina, **Šm-kamn (1, 2)** – vzorca kamnoloma Šmihel pod Nanosom **Verd-kamn.** – vzorec kamnoloma Verd.

Vrednosti OSS za vzorca P1 in P2 iz Paradane sta bili z 1,6 % in 1,4 % najbližje rečnemu sedimentu Ljubljane. Meritve ostalih vzorcev jamskih sedimentov so bile v enakem razponu kot smo jih določili za vzorce kamnin iz kamnolomov; od 0,75 % (vzorec P3) do 0,22 % (vzorec Po2) izgubo teže. (Sl. 11-A). Ti rezultati kažejo, da se meritve organske snovi jamskih sedimentov ne razlikujejo od geološkega ozadja anorganskega ogljika v kamninah.

Skupnega organskega ogljika je v analiziranih jamskih sedimentih manj od 9,3 mg TOC / g suhega sedimenta (vzorec P1), z najnižjo vsebnostjo 1,3 mg/g suhe snovi pri vzorcu Po2

(Sl. 11-A). Ker smo vsebnost celokupnega organskega ogljika preračunali iz rezultatov meritev OSS, ostaja vprašanje koliko teže pri sežigu se je izgubilo na račun anorganske snovi v vzorcih jamskih sedimentov in kakšen delež dobljenega rezultata za TOC predstavlja anorganski ogljik. Posledično sklepamo, da je dejanska vsebnost organskega ogljika v sedimentih manjša od naših izračunov.

4.1.5 Tekstura

V spodnji Preglednici 6 so zbrani rezultati sedmih teksturnih razredov za vzorce jamskih sedimentov. Za primerjavo naših vzorcev s površinskimi tlemi smo uporabili rezultate iz diplomskega dela (Godicelj, 2011).

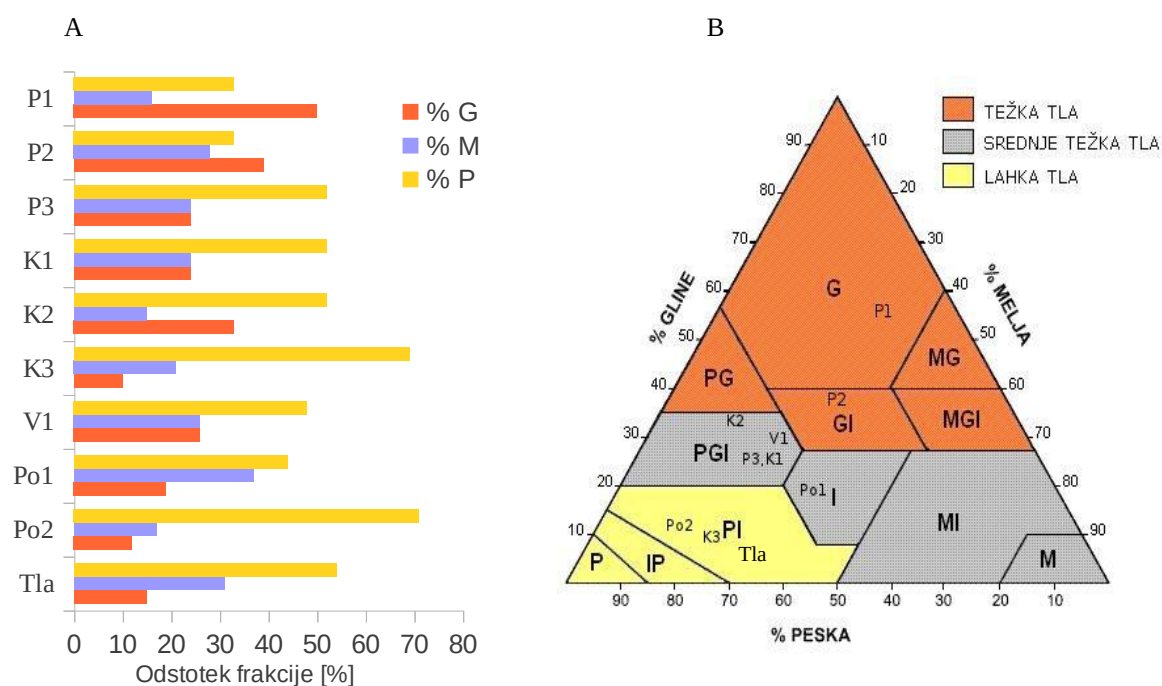
Preglednica 6: Teksturne frakcije vzorcev in tip sedimenta določen po USDA klasifikacijskem sistemu.

Vzorec	% GP	% G	% FM	% GM	% FP	% M	% P	Tip sedimenta (USDA sistem)
P1	0,1	51,0	16,0	0,0	32,9	16,0	33,0	G – glina
P2	0,8	39,0	23,0	5,0	32,2	28,0	33,0	GI – glinasta ilovica
P3	3,1	24,0	19,0	5,0	48,9	24,0	52,0	PGI – peščeno glinasta ilovica
K1	9,8	24,0	18,0	6,0	42,2	24,0	52,0	PGI – peščeno glinasta ilovica
K2	3,8	33,0	8,0	7,0	48,4	15,0	52,0	PGI – peščeno glinasta ilovica
K3	8,9	10,0	10,0	11,0	60,0	21,0	69,0	PI – peščena ilovica
V1	8,8	26,0	21,0	5,0	39,2	26,0	48,0	PGI – peščeno glinasta ilovica
Po1	1,1	19,0	27,0	10,0	42,9	37,0	44,0	I – ilovica
Po2	1,6	12,0	11,0	6,0	69,4	17,0	71,0	PI – peščena ilovica
Tla	13,2	14,8	23,0	8,2	40,8	31,2	54,0	PI – peščena ilovica

Vzorci: P(1,2,3) – Paradana, K(1,2,3) – Križna jama, V1 – Rimljanka, Po(1,2) – Postojnska jama.
Parametri: GP – glinast pesek, G – glina, FM – fin melj, GM – grob melj, FP – fin pesek, M – melj, P – pesek. Zaradi izvedbe meritev brez ponovitev, standardni odklon ni podan.

Podatke smo za lažjo interpretacijo grafično predstavili (Sl. 12-A) in umestili vzorce v teksturni trikotnik z uporabo USDA klasifikacijskega sistema (Sl. 12-B), z razdelitvijo po

Plaster-ju. Večina vzorcev sedimenta, P3, K1, K2, V1, Po1, se je v teksturnem trikotniku uvrstila v srednje težko skupino tal, z najpogostejše določenim tipom PGI – peščeno glinasta ilovica. V težko skupino tal sta se uvrstila vzorca P1 in P2, s presežkom glinene frakcije, v lahko pa vzorca K3 in Po2, s presežkom peska v vzorcu (Sl. 12-B).



Slika 12: Teksturne frakcije prikazane z grafom (A) in uvrščene v teksturnem trikotniku USDA klasifikacije (B) z razdelitvijo po Plaster-ju, 1992 (Zupan in sod., 1998).

Parametri: **G** – glina, **PG** – peščena glina, **MG** – meljasta glina, **GI** – glinasta ilovica, **MGI** – meljasto glinasta ilovica, **PGI** – peščeno glinasta ilovica, **I** – ilovica, **MI** – meljasta ilovica, **PI** – peščena ilovica **P** – pesek, **IP** – ilovnat pesek, **M** – melj.

Vzorec P2 je imel najbolj enakomerno razmerje med frakcijami gline peska in melja in je skupaj z vzorcem P1 izstopal po vsebnosti gline v sedimentu. Zaradi izpostavljenosti prepihu in ledu, je visok odstotek gline vzorca P1 najverjetneje posledica mehanskega preperevanja sedimentnega materiala in vetrnega nanosa prahu skozi brezno nad dvorano, kjer smo ga vzorčili. Vzorec P2, odvzet 20 m globlje v jami na pobočju s prodrom, je bil sicer izpostavljen večjemu nihanju med zaledenelostjo površja in taljenjem ledu, kar pospešuje preperevanje sedimenta vendar odstotek gline ni tako izrazito izstopal. Pri

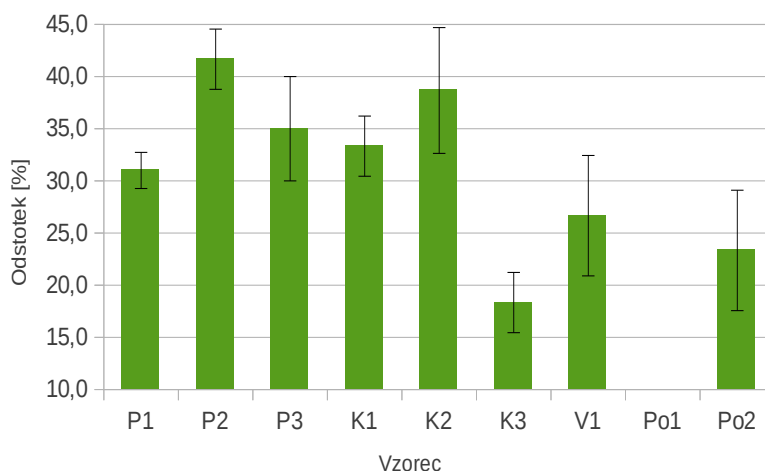
ostalnih vzorcih je prevladoval pesek. To kaže, da so bili ti sedimenti bolj sprani, kar je značilno za vodne nanose, aluvij ali posipanje tal (White, 2007). Vzorec poljskih tal se nahaja v lahki skupini v teksturnem trikotniku (Slika 12), skupaj z vzorcema Po2 in K3. Zaradi poplavljanja mesta vzorčenja Po2 v Rovu koalicije voda stalno spira ves drobn material. Posledično smo v tem vzorcu namerili največji delež peska, 71 %. Z 69 % peščene frakcije mu sledi vzorec K3 Križne jame iz sedimenta v bližini osamelega jezera. Slednji ima glede na vzorca K1 in K2, odvzeta iz sloja 10 m nad gladino jezera, za 27 % večjo peščeno frakcijo. Ker voda in hranila iz peščenih tal hitreje iztečeta, sta imela vzorca K3 in Po2 najmanjšo vsebnost OSS (Sl. 11), vzorec K3 pa je imel tudi najnižji vrednosti za WHC, vlažnost sedimenta (Sl. 9) in najmanjši volumen por (Sl. 13).

Vzorca P3 in K1 imata popolnoma enako sestavo in omogočata analizo dejavnikov, ki poleg teksture vplivajo na zadrževanje vode in hranil ter poroznost. Vzorec V1 ima enako strukturo razporeditve delcev, le v drugačnih deležih.

4.1.6 Poroznost vzorcev sedimenta

Na Sliki 13 so prikazani rezultati meritev na podlagi Pregl. 4 na začetku poglavja. Zaradi manjše količine vzorčenega sedimenta iz Postojnske jame, smo meritve vzorca Po2 opravili s polovično količino, za vzorec Po1 izvedba ni bila mogoča.

Volumen por med delci v sedimentu je neposredno odvisen od teksture in strukturiranosti vzorca ter vpliva na zmožnost zadrževanja vode. V teoriji imajo vzorci z več gline večjo poroznost in boljšo sposobnost zadrževanja vode in hranil.

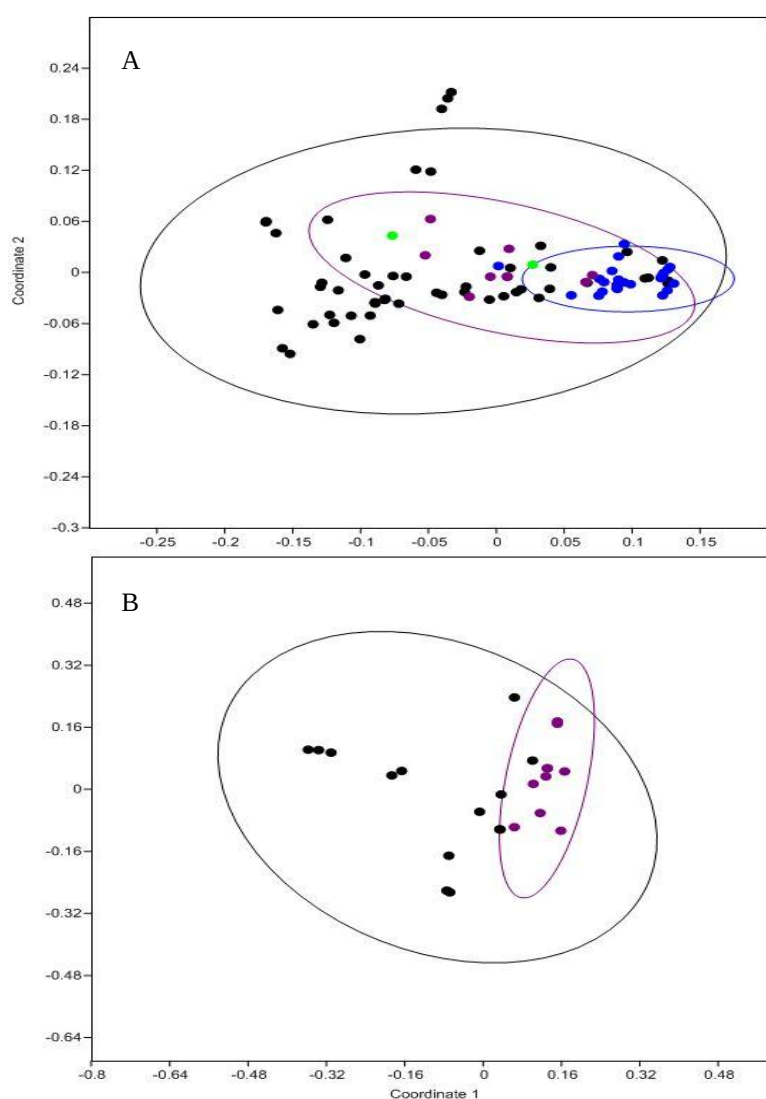


Slika 13: Volumen por v vzorcih sedimenta. Za vzorec Po1 izvedba eksperimenta ni bila mogoča.

S podatki o teksturi vzorcev (Sl. 12) in vsebnosti suhe organske snovi v vzorcih (Sl. 11) si lahko razlagamo najmanjšo poroznost pri vzorcih K3 in Po2 zaradi pretežne vsebnosti peska in majhne vrednosti OSS. Vzorec P1 je imel sicer največ glinenih delcev in organske suhe snovi v vzorcu, vendar je bila količina peska glede na melj veliko večja kot pri vzorcu P2, ki ima večji volumen por. Torej na poroznost ne vpliva samo glinena frakcija, ampak skupno razmerje manjših delcev (glinina in melj) proti peščeni frakciji. Hkrati lahko preveč glinice v okolju zamaši pore med peščeni delci, posledično se poroznost zmanjša. Zaradi pritiska se poroznost manjša tudi z globino sedimentnega nanosa, vendar pri vzorcih K1 in K2, ki ju loči meter globine v sedimentnem skladu, rezultati kažejo nasprotno. Za vzorec Po1, ki smo ga prav tako vzorčili v globljih slojih sklada pa zaradi pomanjkljive količine vzorčenega materiala na žalost nimamo rezultata.

4.1.7 Primerjava lastnosti jamskih sedimentov z vzorci površinskih tal

Podatki za 90 vzorcev tal in 9 vzorcev jamskih sedimentov (Tabela A v prilogah) so barvno razvrščeni v skupine: ekvatorialna tla iz Afrike in Brazilijske – ●, hladna tla iz območja Alp, Himalaje in Svalbarda – ●, centralno evropska tla (CE) – ●, ter jamski sedimenti naših vzorcev – ●. Elipsa predstavlja 95 % porazdelitve podatkov.



Slika 14: Razpršenost podatkov vzorcev tal in jamskega sedimenta glede na okoljske parametre, prikazana s programom PAST (Hammer in sod., 2001). **A:** primerjava vzorcev jamskih sedimentov - ●, z vzorci tal po svetu (● - hladna tla, ● - ekvatorialna tla, ● - CE tla,).

B: primerjava vzorcev jamskega sedimenta - ●, z vzorci CE tal iz območja Slovenije - ●.

Analiza okoljskih parametrov vseh 99 vzorcev je pokazala, da se vzorci jam niso razlikovali od vzorcev centralno evropskih tal in so bili bolj heterogena skupina od vzorcev hladnega tipa tal (Sl. 14-A). Celotna elipsa, ki kaže razpršenost jamskih vzorcev, se nahaja znotraj 95 % porazdelitve CE tal, zajema oba vzorca za ekvatorialna tla in se ujema s $\frac{3}{4}$ porazdelitve podatkov skupine hladnih tal. V primerjavi jamskih sedimentov z vzorci tal Slovenije smo pridobili podobno sliko (Sl. 14-B). Vsi vzorci iz jam so se v povprečju nahajali znotraj opisane 95 % porazdelitve površinskih tal, le razpršenost podatkov je manjša.

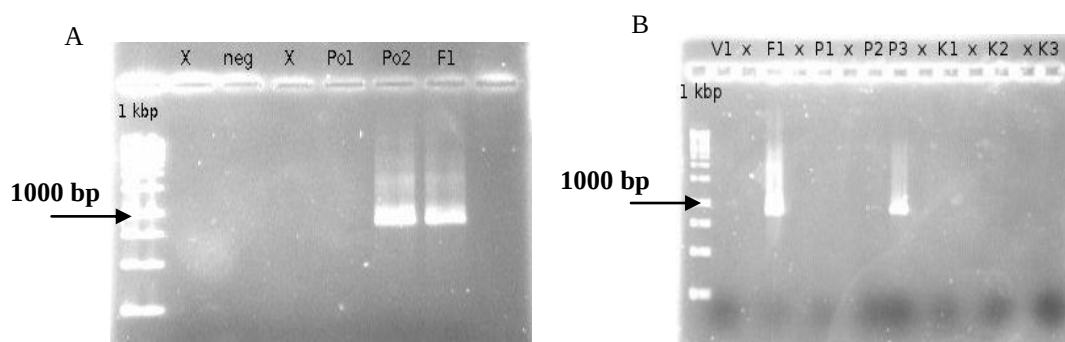
4.2 MOLEKULARNE ANALIZE BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V JAMSKIH SEDIMENTIH

4.2.1 Izolacija DNA iz vzorcev jamskega sedimenta pred inkubacijo s talnim ekstraktom

Po treh ponovitvah izolacije celokupne DNA iz vzorcev sedimenta, smo z gelsko elektroforezo zaznali molekularni signal samo pri vzorcih P3 in Po2. Po pomnoževanju gena za 16S rRNA vseh treh ponovitev izolirane DNA, s parom začetnih oligonukleotidov 27f in 926R, je rezultat ostal nespremenjen; DNA smo zaznali samo v omenjenih dveh vzorcih od devetih (Sl. 15).

Pri vzorcu Po2, zaradi nedavnih, vidnih sledi poplav na območju vzorčenja predvidevamo, da je bila združba, ki smo jo zaznali sveže naplavljen v jamo. Vzorec P3 je bil odvzet z naključnim vzorčenjem po 10 m pobočja na globini 150 m v Paradani in izstopa od ostalih vzorcev po presežku masnega odstotka vode, ki je višji od kapacitete zadrževanja vode v sedimentu. Z vzorčenjem po večjem delu terena smo povečali možnost, da zajamemo večje število mikroorganizmov v vzorec, višek vode v sedimentu pa kaže na kolonizacijski dogodek, kot pri vzorcu Po2. Zaradi slabšega poznavanja hidrologije vzorčenega dela Paradane lahko samo ugibamo o možnem vzroku. Najverjetneje se zaradi temperaturne

inverzije v jami na vzorčeni globini 150 m pri 1 °C led že tali ali pa je pred vzorčenjem ta predel poplavilo. Pri obeh vzorcih, Po2 in P3, je bila torej združba, ki smo jo zaznali najverjetneje nedavna vnesena v sediment iz površja, medtem ko mikrobne združbe v bolj ohranjenih sedimentih nismo zaznali z uporabljenim postopkom.

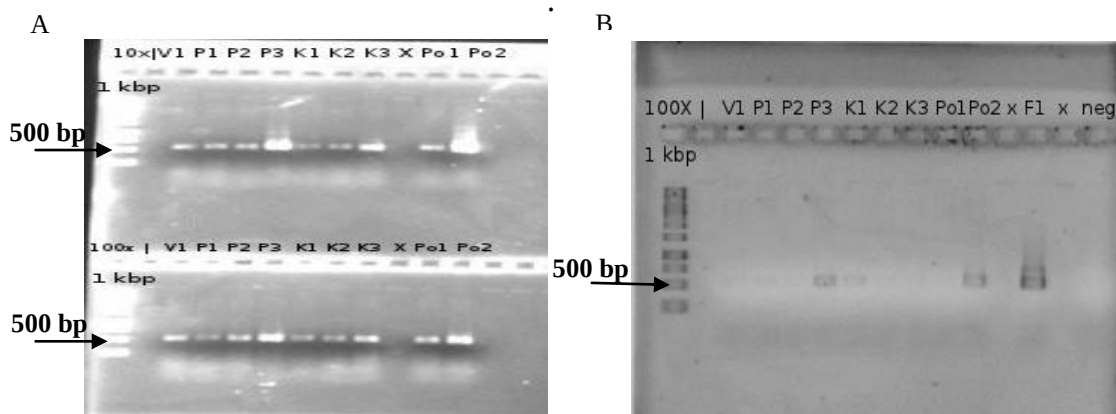


Slika 15: Gelska elektroforeza produktov reakcije PCR, s 27f-926R parom začetnih oligonukleotidov, za nerazredčeno DNA vzorcev v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom.

A: Vzorca Postojnske jame s pozitivno kontrolo F1. **B:** V1-Rimljanka, F1-pozitivna kontrola, P(1, 2, 3)-Paradana, K(1, 2, 3)-Križna jama.

4.2.2 Redčenje DNA iz vzorcev jamskega sedimenta

Delovanje polimeraze, encima verižne reakcije pomnoževanja, pogosto preprečujejo zaviralni dejavniki. Ti so največkrat ostanki nečistoč v končni suspenziji izolacije okoljske DNA. Da bi zmanjšali koncentracijo in vpliv inhibitornih molekul na PCR, smo končno suspenzijo DNA, izolirano iz jamskih sedimentov, pred reakcijo pomnoževanja 10-krat in 100-krat redčili (Sl. 16).



Slika 16: Gelska elektroforeza produktov reakcije PCR, s 27f-518R parom začetnih oligonukleotido ter razredčeno DNK, izolirano iz vzorcev jamskih sedimentov v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom.

A- zgoraj: 10-krat zredčena DNA vzorcev, **A- spodaj:** 100-krat zredčena DNA. **B** – ponovitev 100-kratnega redčenja s pozitivno kontrolo (F1) in kontrolo redčenja (neg).

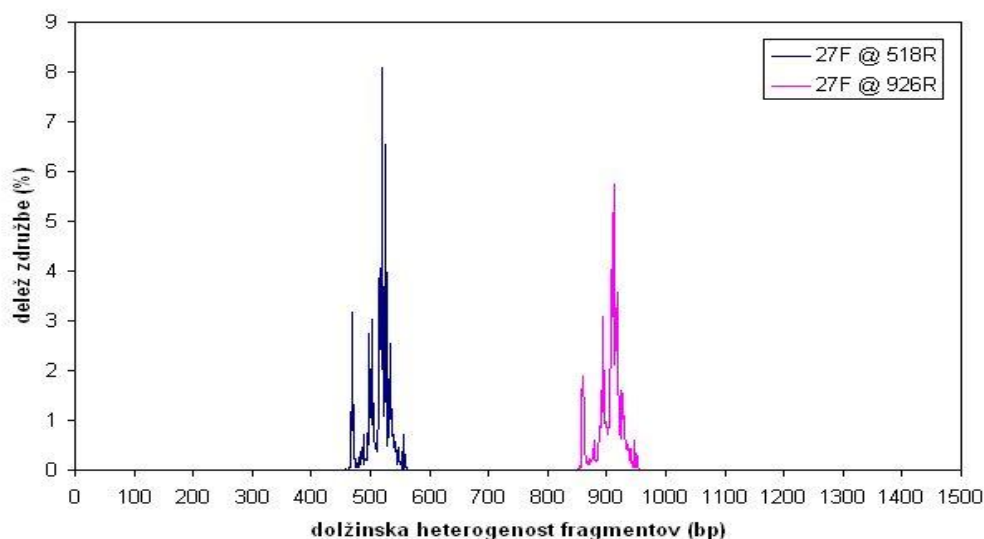
Oznake: V1-Rimljanka, P (1,2,3)-Paradana, K (1,2,3)-Križna jama, Po (1,2)-Postojnska jama.

Za vse vzorce smo pri obeh stopnjah redčenja pridobili produkte (Sl. 16). V vseh nadaljnjih korakih pomnoževanja smo zato uporabili 100-krat razredčene suspenzije izolirane DNA ter 27f-518R par začetnih oligonukleotidov.

4.2.3 Rezultati bioinformatične analize

Dolžinska raznolikost produktov pomnoževanja ter restrikcije je zelo pomemben parameter, ki določa natančnost tehnik LH PCR in TRFLP (Stres, 2006). Pri analizi strukture okoljskih združb pogosto dobimo pomnožke oz. fragmente restrikcije enakih dolžin, ki izvirajo iz različnih mikroorganizmov. Posledično program, s katerim obdelujemo podatke, prepozna samo en vrh v katerem je lahko signal različnih bakterij. Za čim boljši prikaz dejanske raznolikosti bakterijskih združb je torej izbira para začetnih oligonukleotidov in restrikcijskih encimov eden izmed ključnih korakov.

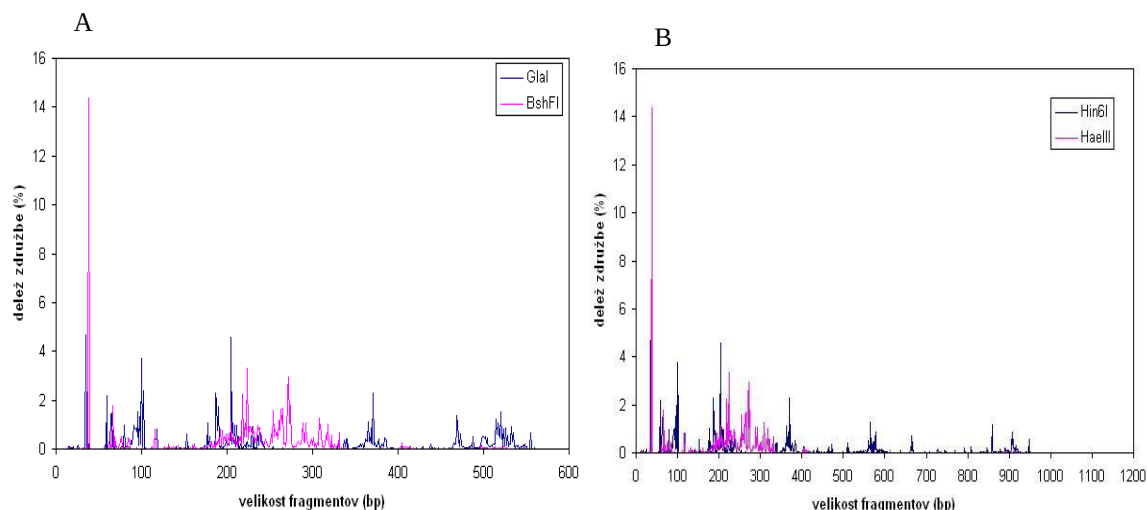
Analiza potencialne dolžinske raznolikosti



Slika 17: Analiza dolžinske raznolikosti s programom BEsTRF (Stres in sod., 2009), za para začetnih oligonukleotidov 27f-518R (modri vrh) in 27f-926R (rdeči vrh) na podlagi nabora 166.945 okoljskih sekvenc gena za 16S rRNA iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009).

Pri analizi s programom BEsTRF simuliranega vzorca izbranih 166.945 sekvenc iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009) smo ugotovili, da nastanejo pri pomnoževanju s parom začetnih oligonukleotidov 27f-518R produkti z dolžino okoli 500 bp, med katerimi je 353 dolžinsko različnih razredov. S parom 27f-926R nastanejo okoli 900 bp dolge sekvence s 313 dolžinskih razredov. Produkti pomnoževanja s prvim parom so dolžinsko ustrezali meji detekcije kapilarne elektroforeze (530 bp) in so imeli večje število različno dolgih produktov (Sl. 17), zato smo se odločili za uporabo para oligonukleotidov 27f in 518R.

Analiza potencialnih fragmentov restrikcije



Slika 18: *In silico* analiza restrikcijskih fragmentov s programom BEsTRF (Stres in sod., 2009) za tri različne encime in dva para začetnih oligonukleotidov, na naboru 166.945 sekvenc gena za 16S rRNA okoljskih študij iz podatkovne baze RDP II (Cole in sod., 2009).

A: Fragmenti restrikcije z encimom *GluI* in *HaeIII* (*BshFI*), s parom začetnih oligonukleotidov 518r-27f.

B: Fragmenti restrikcije z encimom *Hin6I* in *HaeIII*, s parom začetnih oligonukleotidov 926r-27f.

Pri uporabljenem paru začetnih oligonukleotidov 27f-518R (Sl. 18-A), bi bil encim *GluI* najboljša izbira za restrikcijo pomnoženega gena za 16S rRNA. S to restriktazo smo v *in silico* analizi dobili 631 unikatnih terminalnih restrikcijskih fragmentov (TRF), dolgih do 600 bp, kar presega mejo za natančno določanje velikosti fragmentov na kapilarni elektroforezi z izbranim internim standardom. Zato smo izbrali encim *HaeIII*, s katerim smo v *in silico* analizi dobili 532 TRF z 99 % od teh pod optimalno mejo za ločevanje na kapilari. Pri 27f-926R paru oligonukleotidov, so bili rezultati podobni kot pri krajšem pomnožku 27f-518r para. Porazdelitev vrhov je bila podobna, najbolj primeren bi bil restrikcijski encim *Hin6I*, s katerim smo v *in silico* analizi dobili 961 unikatnih TRF, dolgih do 1200 bp. Z restrikcijskim encimom *HaeIII* smo v *in silico* analizi dobili manj (723) TRF, vendar krajših od 500 bp.

Za restrikcijo gena, ki kodira 16S rRNA smo za analizo združb s TRFLP nastavili PCR s 27f-518R parom in izbrali encim *HaeIII* za restrikcijo pomnožkov.

Čeprav je bilo v *in silico* analizi število unikatnih fragmentov restrikcije manjše, je

ločljivost fragmentov na kapilari boljša ter možna primerjava s tehniko LH-PCR (enaki pomnožki pri obeh tehnikah).

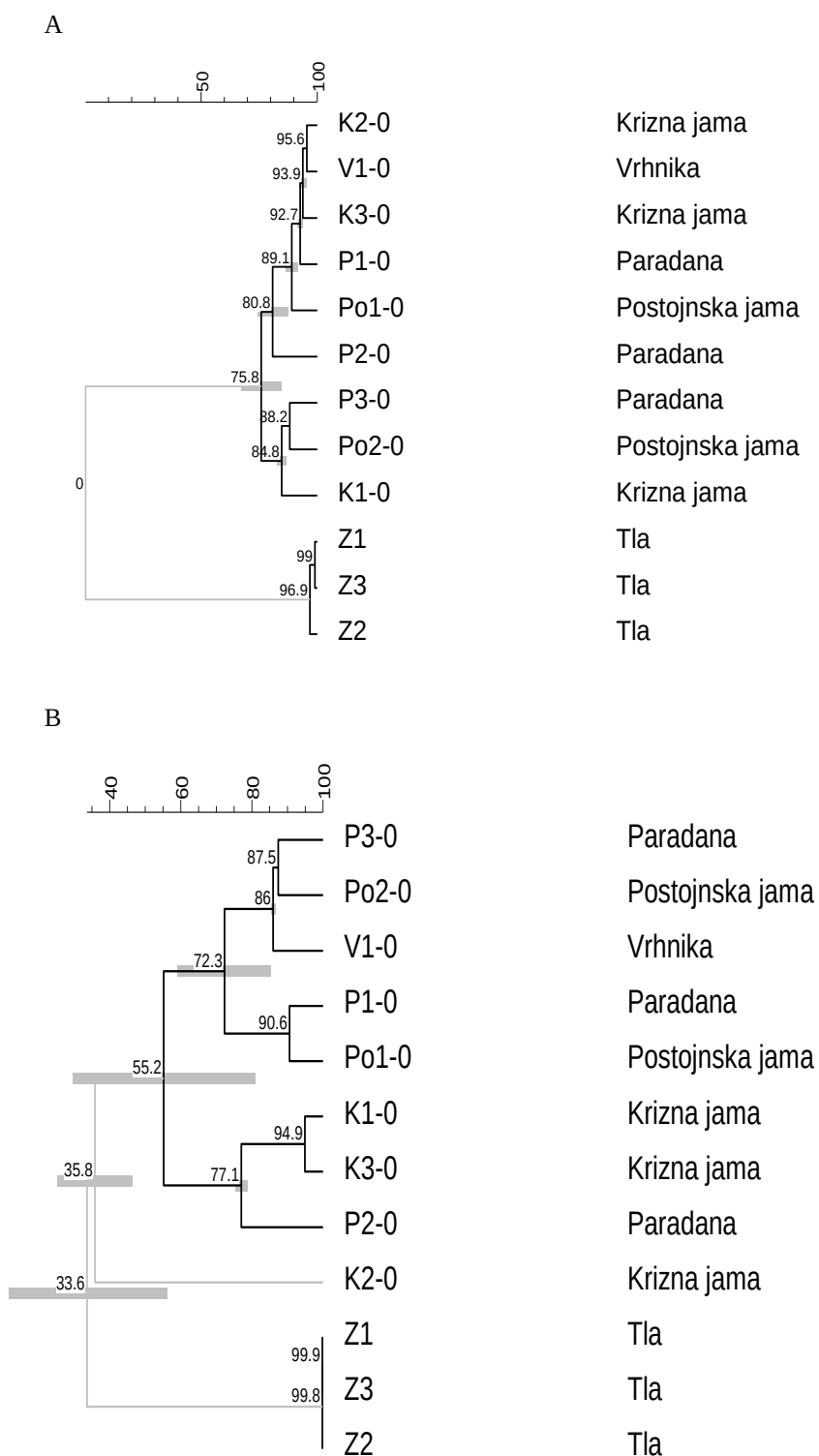
4.2.4 Analiza bakterijskih združb jamskih sedimentov v začetnem stanju, pred inkubacijo s talnim ekstraktom, s tehnikama LH PCR in TRFLP

Pri obeh analizah, LH PCR in TRFLP, se je bakterijska združba iz jam razlikovala od združbe v tleh (Sl. 19). Vse tri ponovitve vzorca tal (Z1, 2, 3) so se uvrstile v ločeno skupino s stopnjo homolognosti skupka nad 96,9 %.

Profili LH PCR jamskih vzorcev so se 100 % razlikovali od združbe v tleh. Po profilu restrikcijskih fragmentov se je struktura bakterijske združbe jamskih vzorcev v 33,6 % ujemala z združbo vzorcev iz tal. Z določanjem odstotka homolognosti posameznih skupkov (angl.: *cut off value*), je bila pri drevesu LH PCR med vzorci sedimenta 75,8 % podobnosti, medtem ko je bila ta podobnost pri drevesu TRFLP za skoraj polovico manjša. Vzorec K2 iz Križne jame je imel po profilu TRF le 35,8 % podobnosti s preostalimi vzorci iz jam. Čeprav ne izstopa v nobenem izmed izmerjenih dejavnikov okolja (pH, % WHC, % w, IMM, tekstura in poroznost), se združba v vzorcu K2 v enaki meri razlikuje od ostalih jamskih vzorcev, kot se vzorec iz površinskih tal razlikuje od vseh jamskih vzorcev.

Ne glede na izbrano metodo se vzorci sedimenta iz iste jame večinoma nahajajo v različnih skupinah, ne tvorijo značilnih skupkov za razliko od kontrolnega vzorca tal. Pri takšni razvrstitvi jamskih vzorcev vidimo, da so razlike v strukturi združbe med različnimi vzorčenimi mesti iste jame vsaj enako velike kot med vzorci iz različnih jam.

Vzorca P3 in Po2 sta bila edina pri obeh profilih uvrščena skupaj v par, z 88,2 % podobnosti pri LH PCR in 87,5 % pri dendrogramu tehnike TRFLP. Če privzamemo, da smo z direktno izolacijo zaznali DNA v sedimentu teh dveh vzorcev zaradi nedavnega vnosa mikroorganizmov z vodo (Sl. 15), potem je struktura združbe, ki je kolonizirala sediment različnih jam homologna, z le majhnim odstotkom razlike od združbe v ohranjenih sedimentih.

**Slika 19:** Dendrograma profilov tipizacije bakterijske združbe v vzorcih jamskih sedimentov in vzorcu tal.**A:** Tipizacija po metodi LH PCR, **B:** tipizacija po metodi TRFLP.

4.2.5 Analiza bakterijskih združb jamskih sedimentov začetnega in končnega stanja inkubacije s talnim ekstraktom, s tehnikama LH PCR in TRFLP

V spodnjih tabelah smo zbrali podatke o hranilni vrednosti ekstrakta glede na fizikalno kemijske meritve (Pregl. 7) in koncentraciji izolirane DNA iz vzorcev jamskega sedimenta pred in po inkubaciji (Pregl. 8).

Preglednica 7: Fizikalno-kemijski parametri analiz vzorca tal in ekstrakta hranil iz tal, po protokolih Sabine Kolbl (Doktorska disertacija v pripravi, FGg).

Parameter	pH	IMM	1/IMM	OSS [%]	TOC [%]	S-N[mg/l]	NH ₄ ⁺ [mg/l]
Vzorec	6,8±0,3	0,18±0,02	5,49±0,49	7,05±0,22	4,09±0,13	28,7±0,8	15,5±1,5

Parametri: **pH**- kislost ekstrakta **IMM**- indeks molekulske mase DOM v ekstraktu, **1/IMM**- recipročna vrednost indeksa, **OSS**- organska suha snov vzorca tal **TOC**- celokupni organski ogljik v vzorcu tal, **S-N** – skupna vsebnost dušika v ekstraktu, **NH₃**- vsebnost amonijskega dušika v ekstraktu.

Ekstrakt je imel v primerjavi z vzorcem tal in sedimentov bolj kisel pH (Pregl. 4). Vsebnost organske suhe snovi (OSS) vzorca tal, iz katerega smo pripravili ekstrakt, je bila okoli 10-krat večja od namerjene OSS v jamskih vzorcih (Sl. 11), medtem ko je kompleksnost, velikost molekul raztopljene organske snovi (DOM) talnega ekstrakta v povprečju za 36 % večji od mediane indeksa v jamskih sedimentih (Sl. 10).

Glede na izmerjeno količino DNA, dobljene preko slike gela po izvedbi elektroforeze produktov PCR v jamskih sedimentih, pred in po inkubaciji s talnim ekstraktom, je odziv mikrobne združbe zelo različen (Pregl. 8). Pri večini jamskih vzorcev (V1, P2, P3, K1, K3, Po2) smo zaznali povečano koncentracijo genskega materiala po štirih tednih inkubacije, kar pomeni, (i) da se je mikrobna združba iz ekstrakta tal prilagodila na inkubacijske pogoje in na jamski sediment kot rastni medij in/ali (ii) razrast mikrobne združbe prisotne v vzorcih sedimenta pred inkubacijo na račun dodanih hranil.

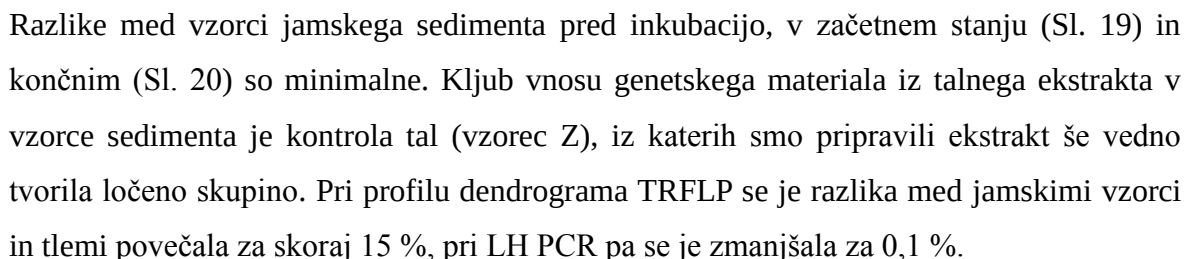
Preglednica 8: Izmerjena relativna koncentracija DNA vzorcev, določena s programom Genetools (Syngene, VB) [ng] glede na izbrani standard 1 kbp lestvice (pri 1000 bp v 1 μ l lestvice = 12 ng DNA) na sliki gela elektroforeze PCR pomnožkov.

	Vzorec										
Inkubacija	V1	P1	P2	P3	K1	K2	K3	Po1	Po2	Neg.	Z
-0	0,9	0,8	0,6	4,5	0,4	2,6	0,5	0,4	3,8		17,2
-1	16,3	0,2	12,0	0,5	6,8	6,6	2,2	0,1	9,6	0,4	
-2	4,8	0,2	1,7	7,0	5,3	1,5	3,4	0,1	1,1	1,9	
-3	9,5	2,0	0,2	10,1	2,0	1,6	0,7	0,1	12,0	8,1	

Oznake: **-0:** mikrobna združba sedimentov pred inkubacijo, **-1, -2, -3:** število ponovitve inkubacije vzorcev sedimenta, **neg:** inkubacija brez sedimenta (ekstrakt+steklene kroglice), združba v ekstraktu iz tal. **Z:** pozitivna kontrola, izolacija DNA iz vzorca tal iz katerih smo pripravili talni ekstrakt.

Povečana rast bakterijske mikrobne združbe je bila najbolj vidna pri vzorcu V1, kjer je pri prvi ponovitvi inkubacije vzorca (V1-1) koncentracija DNA le za 0,9 ng manjša od izmerjene DNA v pozitivni kontroli tal (vzorec Z1). Pri vzorcih P1, K2 in Po1 smo po inkubaciji namerili manjšo vsebnost DNA kot v začetnem stanju, pri vsaj dveh od treh ponovitev inkubacije vzorcev. Inkubacijski pogoji (štiri tedni/6 °C) torej niso ustrezali prisotni bakterijski združbi, kot tudi združbi dodani s talnim ekstraktom (neg.). Pri inkubaciji ekstrakta s sterilnimi steklenimi kroglicami (neg.) prav tako opazimo različen odziv bakterijske združbe pri posameznih ponovitvah, z razponom koncentracije DNA 7,7 ng (neg.-1, 2, 3).

Za določanje vpliva dodane združbe in hranil na jamske sedimente in stopnjo podobnosti jamske bakterijske združbe z združbo v površinskih tleh, smo vse navedene vzorce v Preglednici 8, analizirali s tipizacijskima tehnikama LH PCR in TRFLP in predstavili rezultate s podobnostnim drevesom (Slika 20).



Molekularni signal ekstrakta (vzorci neg-1,-2,-3), je imel pri obeh tehnikah večji odstotek podobnosti z združbo vzorcev sedimenta kot z vzorci tal. Po profilu restrikcijskih fragmentov se je združba iz ekstrakta nahajala v eni gruči, skupaj z vzorcem P3-1 in sedimentom Križne jame pred inkubacijo z ekstraktom, K2-0. Ta je bil glede profil TRF združbe vzorcev začetnega stanja uvrščen v stransko skupino z enako podobnostjo združbi iz tal kot z ostalimi vzorci iz jam (Sl. 19). Po raznolikosti dolžine pomnoženega odseka gena za 16S rRNA, se je združba ekstrakta razkropila po drevesu v različne gruče, vendar še vedno z večjo podobnostjo združbi vzorcev sedimenta kot vzorcev tal.

Združba iz tal, ki smo jih uporabili za pripravo ekstrakta, je bila torej po zamrzovanju, centrifugiranju in filtraciji podobna jamski združbi v sedimentih. To ugotovitev najbolj podpre odstotek podobnosti med strukturo združbe v vzorcu sedimenta K2-0 pred inkubacijo, z gručo vzorcev neg. 1, 2, 3, ki predstavljajo molekularni signal ekstrakta (Sl. 20-B). Pri obeh drevesih pa se ponovitve kontrole inkubacije največkrat pojavljajo v isti gruči z vzorci iz ledenice v Paradani.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Analize okoljskih dejavnikov

Po speleoloških značilnostih imata od vzorčenih jam največ skupnih točk Križna in Postojnska jama. Obe sta horizontalni, dolgi več kot 8 km oz. 20 km, imata stalni pretok vode in redni turizem, le da je slednji številčno manjši v Križni jami in predstavlja občutno manjše breme za jamski habitat kot v Postojnski jami (razsvetljava, prevoz z vlakom, itd.). Medvedji rov in Rov koalicije, v katerih smo odvzeli vzorce Križne in Postojnske jame, sta bila izven glavne turistične poti in rednega pretoka vode. Prav tako so bila vzorčena mesta obeh jam predhodno večkrat uporabljena v geoloških in arheoloških raziskavah. V opisanih lastnostih ima jama Rimljanke ravno nasprotne pogoje. Za časa vzorčenja je bila praktično neobljudena, nastala je ob prelomu, je večinoma vertikalna in je najmanjša izmed vseh vzorčenih jam. Nima aktivnega podzemeljskega pretoka vode, torej voda s hranili vstopa le s prenikanjem skozi površje.

Če primerjamo rezultate fizikalnih in kemijskih lastnosti okolja vseh vzorcev iz treh zgoraj omenjenih jam, ne vidimo bistvenih razlik pri nobeni analizi. Vzorci iz Križne jame ne kažejo večjih ujemanj z rezultati Postojnske jame kot z vzorcem iz Rimljanke. Vzorca Po2, iz občasno poplavljenega sedimenta Postojnske jame, in K3, odvzet iz spodkopane sigove kope v Križni jami, blizu podzemnega jezera, sta imela največ podobnih rezultatov meritev okoljskih dejavnikov, medtem ko vzorec K2 iz sredine sedimentnega sklada kaže največje ujemanje z vzorcem V1 iz Rimljanke. S primerjavo posameznih vzorcev iz različnih jam je razvidno, da na sedimente bolj vplivajo lastnosti neposredne okolice, kjer lahko nastanejo zelo raznolike niše, kot pa splošne značilnosti celotne jame (Culver in Pipan, 2009).

Velika ledenica v Paradani je zaradi prisotnosti ledu in prepiha v zgornjem predelu jame, relativno visoke nadmorske višine vhoda in vertikalnega terena povsem izstopala od ostalih vzorčenih jam. Svojevrstna narava te jame se je najbolj izrazila pri analizah vode, teksturi in vsebnosti organskega ogljika v vzorcih odvzetih do 120 m globine (P1 in P2). Ta

vzorca, odvzeta v zaledenem predelu jame, sta imela za razliko od vseh ostalih pretežno glinasto frakcijo v sedimentu (Sl. 12) in najvišji izmerjeni delež organske suhe snovi OSS, ki je bil primerljiv z rečnim sedimentom Ljubljance (Sl. 11). Izmerjeni fizikalno-kemijski parametri vzorca P3 so najmanj odstopali od vzorcev iz ostalih jam, kar nakazuje, da se z globino vpliv ledenice na dejavnike okolja v jami manjša. Rezultati analize vode vseh treh vzorčenih sedimentov iz ledenice so pokazali velika nihanja v vsebnosti vode (% w) na dan vzorčenja, kljub skoraj enaki zadrževalni kapaciteti sedimenta (% WHC) (Sl. 9). Predvidevali smo, da je takšno odstopanje v vlažnosti sedimenta posledica temperaturne inverzije v jami, ki povzroči, da se z globino jame postopoma topi led ter zaradi izsušitve sedimentov, ki so izpostavljeni stalnemu prepihu.

Večina odvzetih jamskih sedimentov se torej po fizikalno-kemijskih lastnostih ne loči med seboj glede na to, iz katere jame so bili odvzeti, saj obstajajo velike razlike znotraj posameznih mest vzorčenja jamskih sedimentov znotraj iste jame. Pri rezultatih tipizacije vzorcev sedimenta v začetnem stanju, pred inkubacijo z ekstraktom hranil (Sl. 19), prav tako ni bilo videti razlik v strukturi mikrobnih združb med posameznimi jamami. Pri vejitvi dreves obeh tipizacij vzorci niso tvorili značilnih skupkov glede na prisotnost turizma, vode, prepiha ali kateregakoli opisanega parametra okolja. Iz tega sklepamo, da lahko znotraj ene jame s primerno izbiro mest vzorčenja glede na klimatske in geološke pogoje odkrijemo enako raznolike mikrobne niše kot med različnimi jamami.

Zaradi pomanjkanja podatkov iz literature in majhnega števila tovrstnih raziskav jamskih sedimentov, smo se pri interpretaciji naših podatkov pogosto oprli na analize vzorcev tal. Iz splošne primerjave lastnosti različnih tal po svetu, iz Evrope in Slovenije, z lastnostmi jamskih sedimentov (Sl. 14) lahko ugotovimo, da se glede na zajete parametre v analizi, fizikalno-kemijske lastnosti jamskih sedimentov ne razlikujejo bistveno od lastnosti površinskih tal. Edini opaženi razliki med tema skupinama sta vsebnost organskega ogljika TOC, ki je splošno vsaj 10-krat višja v tleh (Sl. 11) in razmerje med aktivnim in pasivnim pH, kjer je po dodatku KCl razlika v vsebnosti vodikovega iona v jamskih sedimentih tudi do 8-krat večja kot v tleh (Sl. 8, Pregl. 5). Pri meritvah TOC s sežigom jamskih sedimentov, je razmerje med organsko in anorgansko snovjo v vzorcih, ki je v prid anorganskemu ogljiku, interferiralo z našimi meritvami. Z določanjem odstotka izgube teže pri sežigu anorganskih vzorcev kamnin, smo ocenili napako pri meritvah jamskih vzorcev,

vendar so podane končne vrednosti TOC v sedimentih le približek dejanskega stanja.

Na osnovi zbranih podatkov v tej študiji torej nismo mogli ovreči druge ničelne hipoteze, da se jamski sedimenti v okoljskih lastnostih ne razlikujejo od površinskih tal. To seveda ne pomeni da, s številčno večjim naborom podatkov, ki bi vseboval tudi večje število merjenih spremenljivk, ne bi ugotovili drugačnih povezav. V mikrobiologiji tal in tudi v mikrobiologiji sedimentov se je kot pomembna ovira pri naših raziskavah pokazalo splošno pomanjkanje objavljenih izmerjenih prekrivajočih se spremenljivk v različnih tipih okolij. Kljub številčnim študijam različnih tipov tal so večinoma glavni predmet raziskav pridobitev mikrobnih sekvenc medtem, ko je opis okoljske komponente vzorčnega mesta pomanjkljiv. To ugotovitev podpira tudi naš pregled literature, izbrane za razširitev obstoječe podatkovne zbirke osnovnih fizikalno-kemijskih lastnosti tal (Godicelj, 2011) in sedimentov (Priloga A). Kot spremenljivke smo lahko upoštevali le 5 parametrov od vseh izmerjenih, saj za druge nismo mogli sestaviti dovolj velikega nabora vzorcev. Zadnji napor pri standardizaciji podajanja podatkov v molekularni biologiji (Yilmaz in sod., 2011) tako le odsevajo še vedno počasen razvoj shranjevanja in obdelave že pridobljenih podatkov tudi na drugih raziskovalnih poljih z bistveno daljšo tradicijo (npr. agronomija). Trenutno je v poteku vzpostavitev baze okoljskih sekvenc z metapodatki o lastnostih vzorca, pridobljenimi po standardiziranem protokolu (Tiedje in sod., 2010). Takšen način zbiranja podatkov daje težo rezultatom sekvenčnih analiz okolja in predstavlja dobro laboratorijsko prakso za nadaljnje raziskave na pedološkem in speleološkem področju.

5.1.2 Molekularne analize

Iz opravljenih eksperimentov analize bakterijskih mikrobnih združb z dvema tipizacijskima tehnikama je razvidno, da se struktura mikrobne združbe tal zelo razlikuje od bakterijskih mikrobnih združb v vseh jamskih sedimentih. Kljub dodatku ekstrakta tal v inkubacijskem eksperimentu se topologija drevesa ni spremenila. V opazovanem časovnem okviru in temperaturnem razponu inkubacije so v končnih vzorcih sedimenta (Sl. 20) opažene enake osnovne razlike kot so bile med začetnimi mikrobnimi združbami (Sl. 19). Mikrobne združbe iz jamskih sedimentov so namreč tvorile nehomogene skupke skupaj z mikrobnimi združbami, ki so nastale z inkubacijo ekstrakta na površju sterilnih kroglic. Ob

uporabi drugih natančnejših orodij v molekularni biologiji za tipizacije mikrobnih združb, kot so masovno sekvenciranje in meritve aktivnosti z radioaktivnimi izotopi predpostavljamo, da bi te razlike bolje opisali in jih navezali s spremembami v okolju. Proti temu, da je do opaznih preureditev prišlo zaradi dodanega ekstrakta tal v mikrobnih združbah sedimentov nam govori tudi dejstvo, da je bila združba iz ekstrakta tal, ki se je razvila na sterilnih kroglicah, zelo podobna nekaterim združbam obstoječih v jamskih sedimentih (vzorci pred inkubacijo). Po tem lahko torej sklepamo, (i) da se je mikroba združba iz tal, iz katerih smo pripravili ekstrakte, bistveno razlikovala od mikrobne združbe na sterilnih kroglicah ob koncu inkubacije ter, (ii) da je združba iz ekstrakta, po temperaturni obdelavi in centrifugiranju, po strukturi podobna jamskim združbam. Časovni okvir, ki smo ga v tej študiji izbrali za inkubacijo (štirje tedni), je daljši od kontaktnega časa v naravnih sistemih po dostopnih podatkih, kjer poplave v današnjem času trajajo od nekaj ur do nekaj dni. Vse skupaj kaže, da se lahko iz mikrobnih združb, ki v jame pridejo iz površinskih odcednih vod, v kratkem času razvijejo združbe na simuliranih jamskih sedimentih (sterilne kroglice), ki so zelo podobne tistim v obstoječih jamskih sedimentih (naši vzorci). Slednjo trditev potrjujejo tudi rezultati tipizacije vzorca Po2. Zaradi vidnih sledi poplavljenosti vzorčnega mesta lahko sklepamo, da je bil vzorec Po2 nedavno koloniziran, a kljub temu ne kaže odstopanj v strukturi mikrobne združbe od ostalih jamskih vzorcev (Sl. 19) razen v večji količini genskega materiala, ki smo ga lahko zaznali že pri direktni izolaciji DNA (Sl. 15). Zaradi ujemanja z rezultati molekularnih analiz vzorca sedimenta P3, v katerem smo namerili presežek vode glede na % WHC (Sl. 9), prav tako obstaja velika verjetnost vnosa bakterij iz površja. V tem primeru se po naših rezultatih bakterijski združbi dveh kolonizacijskih dogodkov različnih jam za manj kot 15 % razlikujeta v strukturi in sta si med seboj bolj podobni kot z združbo v ostalih, ohranjenih sedimentih.

Glede na razlike v bakterijskih mikrobnih združbah med posameznimi jamami in vzorci znotraj iste jame lahko sklepamo, da se ob vsakokratnem pojavu vod lahko vrši nova kolonizacija starejših sedimentov, v katere odcedne vode prodirajo. S tem so obstoječe bakterijske mikrobne združbe rezultat selekcije velikega števila zaporednih kolonizacijskih dogodkov z vstopajočimi bakterijskimi mikrobnimi združbami in rastnimi substrati (koncentracija in vrsta). Sedimenti v jamah torej navkljub oligotrofnemu habitatu

predstavljajo kompleksno okolje za selekcijo, kolonizacijo in preživetje vstopajočih mikrobnih skupin.

5.2 SKLEPI

- Po rezultatih analize osnovnih okoljskih parametrov, se mikrookolja jamskih sedimentov v klimatsko podobnih pogojih odlaganja niso bistveno razlikovala, kar je v skladu s prvo ničelno hipotezo.
- Na osnovi zbranih podatkov v tej študiji nismo mogli ovreči druge ničelne hipoteze, da se jamski sedimenti v okoljskih lastnostih ne razlikujejo od površinskih tal.
- Vzorec tal se je pri obeh tipizacijskih tehnikah bakterijskih združb uvrstil v ločeno gručo na dendrogramih z vsaj 33 % razlike od jamskih sedimentov. Struktura bakterijske mikrobne združbe jamskih sedimentov je torej drugačna od strukture mikrobne združbe v površinskih tleh, od koder te jamske združbe načeloma izvirajo. S to ugotovitvijo zavrnemo tretjo ničelno hipotezo.
- Kot smo predpostavili v četrti ničelni hipotezi, dodatek ekstrakta tal v inkubacijskem eksperimentu ni vplival na strukturo mikrobne bakterijske združbe v vzorcih jamskega sedimenta. Molekularni signal ekstrakta in inkubirani vzorci sedimenta so se na tipizacijskem drevesu pomešali z jamskimi vzorci pred inkubacijo, medtem ko je vzorec tal tvoril ločeno gručo.

V opravljeni analizi okoljskih in mikrobnih komponent v devetih vzorcih klastičnih sedimentov, iz štirih različnih jam slovenskega krasa, smo torej od postavljenih ničtih hipotez tri sprejeli in eno zavrnili.

6 POVZETEK

Mikrobne združbe v podzemnih habitatih in okoljski parametri, s katerimi le-te razpolagajo, so dokaj neraziskano področje jamske mikrobiologije pri nas in po svetu. Večina dosedanjih raziskav je potekala v lahko dostopnih, turističnih, razstavnih jamah ali na mestih z vidno mikrobno aktivnostjo. Naša raziskava temelji na splošnem vpogledu v raznolikost dejavnikov okolja in strukture mikrobnih združb v sedimentnih skladih različnih jam.

Zanimala nas je predvsem stopnja raznolikosti v fizikalno-kemijskih parametrih sedimentov iz različnih jam, razlika v okoljskih dejavnikih in strukturi mikrobnih združb med jamskim habitatom in vzorci tal ter vpliv vnosa hranil in organizmov iz površja v jame.

V ta namen smo odvzeli skupno devet vzorcev klastičnih sedimentov iz Postojnske in Križne jame, Velike ledenice v Paradani in novo odkrite jame Rimljanke. Med seboj se razlikujejo predvsem v stopnji turizma, hidrologiji, temperaturi v jami, terenu in dolžini. Fizikalno-kemijske parametre vzorcev sedimenta smo opisali s pH, analizo vode, teksturo in poroznostjo sedimentov ter z indeksom molekulske mase topne organske snovi. V vseh naštetih spremenljivkah so se vzorci znotraj iste jame enako razlikovali kot vzorci sedimentov med posameznimi jamami.

S sežigom jamskih vzorcev smo določili suho organsko snov (OSS), vrednosti delili s konservativnim faktorjem 1.724 za izračun skupnega organskega ogljika (TOC). Zaradi suma na veliko vsebnost anorganske snovi, ki povzroča napako meritve OSS, smo metodo ovrednotili s sežigom kamnin iz kamnolomov in rečnega sedimenta Ljubljanice. Vrednosti OSS v sedimentih se niso razlikovale od dobljenega anorganskega ogljika pri sežigu kamnin, z izjemo vzorcev P1 in P2, kjer je bila količina organske suhe snovi primerljiva s sedimentom Ljubljanice. Po tem sklepamo, da je vsebnost TOC v jamskih vzorcih manjša od naših izračunov, saj se je dobljena razlika v teži žganih vzorcev deloma izhajala na račun anorganskega ogljika v sedimentu.

Rezultate pH meritev sedimenta, teksture in TOC smo uporabili za dopolnitev zbirke podatkov z 90 vzorcev tal (Priloga A) ter s programom PAST preverili njihovo razpršenost.

Elipsa, ki je opisala 99 % porazdelitve jamskih vzorcev, je sovpadala z razpršenostjo vzorcev CE (centralno evropskih) tal in s tretjino elipse hladnih tal, ki so tvorili bolj homogeno gručo od jamskih sedimentov. Glede na zajete parametre v analizi PAST se sedimenti niso razlikovali od vzorcev tal v okoljskih lastnostih.

Pri izolaciji DNA smo direktno iz vzorcev sedimenta zaznali molekularni signal samo pri vzorcu Po2, iz nedavno poplavljenega predela v Postojnski jami in vzorcu P3, pri katerem smo izmerili presežek masnega odstotka vode glede na zadrževalno kapaciteto sedimenta. Pri obeh vzorcih sumimo, da je prišlo do nedavne kolonizacije območja vzorčenja, posledično je združba številčno večja kot pri ohranjenih sedimentih. Z redčenjem suspenzije izolirane DNA smo zmanjšali vsebnost nečistoč, ki so ovirale pomnoževanje z reakcijo PCR ter tako pridobili šibki molekularni signal tudi pri ostalih jamskih vzorcih.

Za izvedbo molekularnih analiz smo uprizorili naravni vnos hranil in združbe v jame z inkubacijo vzorcev sedimenta s talnim ekstraktom. S tehnikama TRFLP in LH PCR smo analizirali strukturo mikrobne združbe pred in po dodatku ekstrakta. Pred izvedbo tipizacije pa smo opravili bioinformacijsko analizo potencialne dolžinske raznolikosti pomnožkov reakcije PCR, glede na izbrane začetne oligonukleotide ter analizo potencialnih fragmentov restrikcije (TRF), glede na začetne oligonukleotide in restrikcijski encim. V skladu z rezultati *in silico* analize smo za reakcijo pomnoževanja izbrali 27f-518R par začetnih oligonukleotidov in restrikcijo izvedli z encimom *HaeIII*.

Iz topologije štirih končnih dendrogramov (za 2 stanji inkubacije in 2 metodi) smo prišli do ugotovitev, da se je struktura bakterijske mikrobne združbe iz jam povsem razlikovala od združbe v vzorcu tal, kar je bilo opazno tudi po končani inkubaciji z ekstraktom, pripravljenim iz istega vzorca tal. Molekularni signal talnega ekstrakta se je uvrstil med vzorce jamskega sedimenta ter ni vplival na mikrobno strukturo jamskih združb, medtem, ko je vzorec tal ostal v ločeni skupini pri vseh dendrogramih. Mikrobna združba v sedimentih je najverjetneje nastala s selekcijo številnih kolonizacijskih dogodkov, saj je združba nedavno koloniziranih sedimentov in talnega ekstrakta podobna združbi ohranjenih sedimentov pred inkubacijskim eksperimentom.

7 VIRI

- Adetutu E. M., Thorpe K., Shahsavari E., Bourne S., Cao X., Fard R. M. N., Kirby G., Ball A. S. 2012. Bacterial community survey of sediments at Naracoorte Caves, Australia. *International Journal of Speleology*, 41, 2: 137-147
- Bavdek A., Mihevc A., Toškan B., Velušček A. 2009. Arheološke najdbe iz Križne jame. *Arheološki vestnik*, 60: 17-31
- Banks E. D., Taylor N. M., Gulley J., Lubbers B. R., Giarrizo J. G., Bullen H. A., Hoehler T. M., Barton H. A. 2010. Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: a function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal*, 27, 5: 444-454
- Barton A. H. 2006. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68, 2: 43-54
- Barton A. H., Iker C. I., Kambesis P., Oehrle A. S., Groves C. 2010. Microbial atrazine breakdown in a karst groundwater system and its effect on ecosystem energetics. *Journal of Environmental Quality*, 39: 509-518
- Barton A. H., Northup D. E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 1: 163-178
- Biometra. 2003. PCR calculator. Göttingen, Biometra GmbH
<http://www.biometra.de/1070.0.html> (9. 7. 2011)
- Bosák P., Pruner P., Zupan Hajna N., Hercman H., Mihevc A., Wagner J. 2010. Primerjava številčne in korelirane starosti sedimentov z ostanki jamskega medveda v Križni jami. *Acta Carsologica*, 39, 3: 529-549

- Bragazza L., Freeman C., Jones T., Rydin H., Limpert J., Fenner N., Ellis T., Gerdol R., Hájek M., Hájek T., Iacumin P., Kutnák L., Tahvanainen T., Tobermann H. 2006. Atmospheric nitrogen deposition promotes carbon loss from peat bogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 51: 19386–19389
- Chelius K. M., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson T. R., Horrocks R. Moore C. J. 2009. Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology*, 38, 1: 1-10
- Clendenen C. 2009. Karst hydrology in ancient myths from Arcadia and Argolis, Greece. *Acta Carsologica*, 38, 1: 145-154
- Culver D. T., Pipan T. 2009. *The biology of caves and other subterranean habitats*. 1st ed. Oxford, University Press: 253 str.
- Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37, Suppl. 1: D141-D145
- Černigoj M., Pal L., Stres B., Leskovec S., AUSEC L. 2009. Navodila za vaje pri predmetu mikrobiologija tal 2009/2010. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 20 str.
- Engel A. S. 2010. Microbial diversity of cave ecosystems. V: *Geomicrobiology: Molecular and environmental perspective*. Barton L. L. (ed.). Berlin, Springer Science+Business Media: 219-238

Engel A. S. 2012. Microbes. V: Encyclopedia of caves. 2nd ed. White B. W., Culver C. D. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 490-499

Gabrovšek F., Knez M., Kogovšek J., Mihevc A., Mulec J., Perne M., Petrič M., Pipan T., Prelovšek M., Slabe T., Šebela S., Ravbar N. 2011. Development challenges in karst regions: sustainable land use planning in the karst of Slovenia. Carbonates Evaporites, 26: 365-380

Gams I. 2004. Kras v Sloveniji v prostoru in času. 2. izd. Ljubljana, Založba ZRC SAZU: 515 str.

Gerič B., Pipan T., Mulec J. 2004. Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the epikarst of Škocjanske jame caves (Slovenia). Acta Carsologica, 33, 1: 301-309

Godicelj A. 2011. Vpliv prostih nukleinskih kislin na zaznavanje strukture in aktivnosti mikrobnih združb. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije: 76 str.

Google earth 6.2. 2012. Slovenija. Mountain view, Google Inc: 1 str.

<http://www.google.com/earth/index.html> (12. 7. 2012)

Gunde-Cimerman N, Zalar P, Jeram S. 1998. Mycoflora of cave cricket *Troglophillus neglectus* cadavers. Mycopathologia, 141, 2: 111-114

Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4,1: 9 str.

http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf (16. 5. 2012)

Herlec U., Hlad B. 2005. Rojstvo, rast in propad gora ter Gore v geološki zgodovini Slovenije. V: Geotrip '02 v Sloveniji. Hlad B., Jeglič D. (ur.). Ljubljana, Agencija RS za okolje, Tiskarna Ljubljana: 6-69

- JD Logatec. 2002. Načrt sistema ledeniških jam v Paradani: E zapisnik. Nagode M. (ur.). Ljubljana, ZRC SAZU, Kataster Jamarske zveze Slovenija: 1 str. (interno gradivo)
- Jeraj K. 2012. Podatki in načrt jame Rimljanka. Ljubljana, Jamarski klub Železničar (osebni vir, marec, 2012)
- JZS. 2012. Prvo polletno poročilo jamarskega katastra - 2012a. Ljubljana, Jamarska Zveza Slovenija: 1042 str. (Interno gradivo)
- Jones B. 2001. Microbial activity in caves: A geological perspective. *Geomicrobiology Journal*, 18: 345-357
- Kitts C. L. 2001. Terminal Restriction Fragment Patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. *Curent Issues in Intestinal Microbiology*, 2: 17-25
- Megušar F., Sket B., 1977. On the nature of some organic covers on the cave walls. V: *Proceedings of the 6th International congress of speleology, Olomouc, 1973. Vol. 5.* Panoš V (ed.). Praha: Academia: 159-161
- Muyzer G., Waal D. E., Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Mulec J., Zalar P., Zupan Hajna N., Rupnik M. 2002. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). *Acta Carsologica*, 31, 2: 177-187
- Mulec J. 2008. Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian karst caves. *Acta Carsologica*, 37, 1: 153-160

Mulec J. 2012. Perspektive jamske mikrobiologije v Sloveniji. V: Krasoslovje v razvojnih izzivih na krasu 2: Gradnja, turizem, ekologija, varovanje. Pogačnik A. (ur.). Ljubljana, Založba ZRC SAZU: 149-199

Mulec J., Krištufek V., Chroňáková A. 2012a. Comparative microbial sampling from eutrophic caves in Slovenia and Slovakia using RIDA[®]COUNT test kits. *International Journal of Speleology*, 41, 1:1-8

Mulec J., Vaupotič J., Walochnik J. 2012b. Prokaryotic and eukaryotic airborne microorganisms as tracers of microclimatic changes in the underground. *Microbial Ecology*, 63, 2: 239-470

Munsell Soil Color Charts. 1975 ed. Baltimore, Munsell Color: loč. pag.

Nagode M. 2007. Rezultati raziskav v jamah v Paradani. *Gore: Časopis o gorah, gorjancih in gorjankah*, 11, 35: 3-9

Nybroe O., Marsh L. T., Leser D. T., Petersen T. A. 2003. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 1: 53-62

Northup E. D., Lavoie H. K. 2001. Geomicrobiology of caves: A review. *Geomicrobiology Journal*, 18: 199-222

Osburn C. L., Morris D. P., Thorn K. A., Moeller R. E. 2001. Chemical and optical changes in freshwater dissolved organic matter exposed to solar radiation. *Biogeochemistry*, 54, 3: 251-278

Pace R. N., Dojka A. M., Harris K. 2000. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1617-1621

- Pašić L., Kovče B., Sket B., Herzog-Velikonja B. 2010. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 50-60
- Plaster E. J. 1992. Soil science and management. 2nd ed. New York, Delmar Publishers Inc.: 514 str.
- Portillo C. M, Gonzalez M. J. 2010. differential effects of distinct bacterial biofilms in a cave environment. *Current Microbiology*, 60: 435-438
- Ravbar N. 2007. Vulnerability and risk mapping for the protection of karst waters in Slovenia. Application to the catchment of the Podstenjšek springs. Doktorska disertacija, Nova Gorica, Univerza v Novi Gorici: 243 str.
- Sandor F. 2008. Soil testing: Perennial crop support series Jalalabad, Afghanistan. San Francisco, Roots of peace: International Agriculture Programs: 99 str.
[http://www.rootsofpeace.org/assets/Soil%20Testing%20Manual%20V6%20\(Feb%2008\).pdf](http://www.rootsofpeace.org/assets/Soil%20Testing%20Manual%20V6%20(Feb%2008).pdf) (12. 6. 2012)
- Sarbu M. S., Kane C. T., Kinkle K. B. 1996. A chemoautotrophically based cave ecosystem. *Science, New Series*, 272, 5270: 1953-1955
- Sasowsky D. I. 2007. Clastic sediments in caves – imperfect recorders of processes in karst. *Acta Carsologica*, 36, 1: 143-149
- Schumacher A. B. 2002. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. Las Vegas. United States Environmental Protection Agency: 23 str.
<http://www.epa.gov/esd/cmb/research/papers/bs116.pdf> (10. 8. 2012)

- Spilde M. N., Northup D. E., Boston P. J., Schelble R. T., Dano K. E., Crossey L. J., Dahm C. N. 2005. Geomicrobiology of cave ferromanganese deposits: A field and laboratory investigation. *Geomicrobiology Journal*, 22, 3: 99-116
- Stres B. 2006. The first decade of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology. *Acta Agriculturae Slovenica*, 88, 2: 65-73
- Stres B. 2007. Praktikum iz mikrobiologije tal za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 34 str.
- Stres B., Tiedje J. M., Murovec B. 2009. BEsTRF: A tool for optimal resolution of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis based on user-defined primer-enzyme-sequence databases. *Bioinformatics*, 25, 12: 1556-1558
- Sugihara S., Funakawa S., Kilasara M., Kosaki T. 2011. Effects of land management on CO₂ flux and soil C stock in two Tanzanian croplands with contrasting soil texture. *Soil Biology & Biochemistry*, 46: 1-9
- Suhadolc M., Ruprecht J., Zupan M. 2008. Študijsko gradivo za vaje pri predmetu Nauk o tleh. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za pedologijo in varstvo okolja: 50 str.
- Tkavc R. 2007. Identifikacija in genotipizacija entomopatogenih gliv izoliranih iz troglofilnih metuljev *Scoliopteryx libatrix* L. in *Triphosa dubitata* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 80 str.
- Uhlířová E., Šantrůčková H. S. 2001. Growth rate of bacteria is affected by soil texture and extraction procedure. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 217-224

- Waele J. D., Plan L., Audra P. 2009. Recent development in surface and subsurface karst geomorphology: An introduction. *Geomorphology*, 106: 1-8
- Walochnik J., Mulec J. 2009. Free-living Amoebae in carbonate precipitating microhabitats of karst caves and a new vahlkampfiid amoeba, *Allovahlkampfia spelaea* gen. nov., sp. nov. *Acta Protozoologica*, 48, 1: 25-33
- White B. W. 2007. Cave sediments and paleoclimate. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 1: 76-93
- Yilmaz P., Kottmann R., Field D., Knight R., Cole R. J., Amaral-Zettler L., Gilbert A. J., Karsch-Mizrachi I., Johnston A., Cochrane G., Vaughan R., Hunter R., Park J., Morrison N., Rocca-Serra P., Sterk P., Arumugam M., Bailey M., Baumgartner L., Birren W. B., Blaser J. M., Bonazzi V., Booth T., Bork P., Bushman F. D., Buttigieg L. P., Chain S. G. P., Charlson E., Costello E. K., Huot-Creasy H., Dawyndt P., DeSantis T., Fierer N., Fuhrman A. J., Gallery R. E., Gevers D., Gibbs A. R., Glöckner F. O., Genomic Standards Consortium. 2011. Minimum information about a marker gene sequence (MIMARKS) and minimum information about any (x) sequence (MIXS) specifications. *Nature Biotechnology*, 29: 415-420
- Zakon o varstvu podzemnih jam. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 2: 165-175
- Zakotnik T. 2011. Sestava in aktivnost bakterijskih mikrobnih združb v sedimentih Postojnske jame starih do 700.000 let. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 62 str.
- Zakrajšek M., Ferk M., Čekada M., Senegačnik A., Trček I., Zakrajšek W. 2011. Jamarska baza znanja. Ljubljana, Izobraževalna služba Jamarske zveze Slovenije: 18 str.
- Zalar P., Hennebert L. G., Gunde-Cimerman N., Cimerman A. 1997. *Mucor troglophilus*, a new species from cave crickets. *Mycotaxon*, 65, 1: 507-516

Zupan Hajna N., Pruner P., Mihevc A., Schnabl P., Bosák P. 2008. Jamski sedimenti iz Postojnsko–Planinskega jamskega sistema (Slovenija): priča večfaznega razvoja v epifreatični coni. *Acta Carsologica*, 37, 1: 63-86

Zupan Hajna N., Mihevc A., Pruner P., Bosák P. 2010. Palaeomagnetic research on karst sediments in Slovenia. *International Journal of Speleology*, 39, 2: 47-60

Zupan M., Grčman H., Kočever H. 1998. Navodila za vaje iz pedologije: za študente geologije. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 62 str.

ZAHVALE...

... ekipi jamarjev, ki so omogočili vzorčenje sedimentov in posledično tudi raziskavo;

- Marko Erker – JD Logatec, za organizacijo odprave v Veliko ledenico v Paradani, in vso pomoč pri zbiranju gradiva.
- Kristjan Jeraj – JK Železničar, za posredovanje odkritja Rimljanke, vseh podatkov v zvezi z jamo in za piljenje vrvne tehnike pred izpitom.
- g. Alojz Troha, za odobravanje vzorčenja Križne jame in prost vstop v jamo.
- Ostalim udeležencem iz JK Železničar - Mateja Ferk, Primož Gnezda, in JD Gorenja vas - Marko” *the crying caver*”, ki so si vzeli čas za moje 'žličkanje' pod zemljo.

... mentorju: Blaž, hvala za izvirno in iznajdljivo usmerjanje naloge. Kljub vsem vmesnim prigodam in na videz brezkončnemu tipkanju je bilo zabavno. Upam da se srečamo kdaj v hribih.

... somentorju; dr. Janez Mulec, za ureditev dovoljenj odvzema vzorcev, vse nasvete pri urejanju vsebinskega dela, dana gradiva in pomoč pri vzorčenju Postojnske jame.

...dr. Vesni Jerman, za pomoč in potrpljenje pri izvedbi molekularnih raziskav, vse napotke pri urejanju naloge in najlepša hvala za prijazen nasmeh ob spodrseljajih.

... dr. Poloni Zalar za recenzijo diplomskega dela in nepristransko strokovno mnenje.

... Institutu za raziskovanje Krasa, za financiranje laboratorijskega kompleta za izolacijo DNK (kit MOBIO).

... Marku Kodru in Alenki Levart – Katedra za prehrano, BF, za uporabo opreme in meritve suhe in organske snovi.

... Sabini Kolbl – Keter d.o.o., za meritve hranilne vrednosti ekstrakta tal.

... Kamnolomu Vrhnika, za vzorce kamnin.

... Nejcu Mivšku, za ves humor in toplino, sarkazem in priganjanje.

... Nini Nanut, za najboljšo turško kavo v Ljubljani, pomoč pri stanovanjski stiski in lektoriranje angleščine.

... staršem, za vso podporo in potrpljenje tekom študija.

... in hvala, Douglas Adams, za posredovanje življenjskega vodila že na platnici vodiča:

"Samo brez panike"

PRILOGE

Priloga A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

simbol	vzorec	fizikalno- kemijske lastnosti tal						vir	skupina tal
		pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg		
a1	Slovenija – polje1	6,9	24	53	23	2,5	0,3	Stres in sod., 2010	CE
a2	Slovenija – polje2	6,3	24,6	52,4	23	2,6	0,26	Lenarčič, 2006	CE
a3	Slovenija – polje3	7,4	14,8	31,2	54	2,6		Godicelj, 2011	CE
a4	Slovenija – barje1	6,6	60,3	39,3	0,1	15	1,3	Lenarčič, 2006	CE
a5	Slovenija – barje2	6	6	16,3	77,7	15	1,3	Henry in sod., 2006	CE
a6	Slovenija – barje3	7,3	55,6	32	13	15	1,2	Stres in sod., 2010	CE
a7	Slovenija – barje4	7,6	60,3	39,6	0,1	16	1,3	Jerman in sod., 2009	CE
a8	Nemčija	6,7	25	15	60	11,1	0,4	Andreoni in sod., 2004	CE
a9	Italija	7,7	23	24	53	7,7	2,2	Andreoni in sod., 2004	CE
a10	Belgija	8,2	7	8	85	8,2	0,7	Andreoni in sod., 2004	CE
a11	Francija	5,89	14,3	66,6	19,3	0,94	0,1	Henry in sod., 2006	CE
a12	Francija	5,8	33,3	51,3	15,4	1,53	0,17	Henry in sod., 2006	CE
a13	Nemčija 1	4,5	8	12	81	0,62		Weigand in sod., 1995	CE
a14	Nemčija 2	5	11	31	58	0,61		Weigand in sod., 1995	CE
a15	Nemčija 3	6	6	8	86	0,55		Weigand in sod., 1995	CE
a16	Nemčija 4	5,6	10	21	69	0,79		Weigand in sod., 1995	CE
a17	Nemčija 5	7,4	31	45	24	0,67		Weigand in sod., 1995	CE
a18	Nemčija 6	5,7	8	10	82	1,61		Weigand in sod., 1995	CE

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

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

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

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

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

fizikalno- kemijske lastnosti tal									
simbol	vzorec	pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg	vir	skupina tal
a61	Rootmos 1920	6,34	1	23	76	5,409	0,53	Tscherko in sod., 2003	hladna
a62	Rootmos 1850	7,07	1	23	76	12,2	0,63	Tscherko in sod., 2003	hladna
a63	Rootmos ref. Site	5,05	1	23	76	19,3	1,92	Tscherko in sod., 2003	hladna
a64	Svalbard 1	5,71	5,77	6,9	87,33	1,49	0,03	Odor, 2011	hladna
a65	Svalbard 2	4,9	9,8	5,4	84,8	0,60	0,02	Odor, 2011	hladna
a66	Svalbard 3	4,9	11,3	5,1	83,6	0,30	0,01	Odor, 2011	hladna
a67	Svalbard 4	5,77	29	21,57	49,47	0,27	0	Odor, 2011	hladna
a68	Svalbard 5	6,43	9,8	18,13	72,02	0,04	0	Odor, 2011	hladna
a69	Svalbard 6	6,68	12,5	12,57	74,93	0,03	0	Odor, 2011	hladna
a70	Brazilijska	4,8	40	32	28	17,3	1,9	Norghauer in sod., 2008	ekvatorialna
a71	Kenija	6,5	25,3	16,8	57,9	0,2	2	Ziibisch in sod., 1995	ekvatorialna
a72	Paradana P1	7,77	51,0	16,0	33,0	0,93		ta študija, 2012	jamska
a73	Paradana P2	7,85	39,0	28,0	33,0	0,81		ta študija, 2012	jamska
a74	Paradana P3	7,87	24,0	24,0	52,0	0,44		ta študija, 2012	jamska
a75	Križna jama K1	7,78	24,0	24,0	52,0	0,27		ta študija, 2012	jamska
a76	Križna jama K 2	7,82	33,0	15,0	52,0	0,31		ta študija, 2012	jamska
a77	Križna jama K3	7,94	10,0	21,0	69,0	0,15		ta študija, 2012	jamska
a78	Rimljanka V1	7,75	26,0	26,0	48,0	0,40		ta študija, 2012	jamska
a79	Postojnska jama Po1	8,38	19,0	37,0	44,0	0,28		ta študija, 2012	jamska
a80	Postojnska jama Po2	8,46	12,0	17,0	71,0	0,13		ta študija, 2012	jamska
a81	Češka 1	7,4	17	33	50	1,4		Uhlířová in sod., 2002	CE
a82	Češka 2	4,2	11	35	54	6,8		Uhlířová in sod., 2002	CE
a83	Češka 3	3,5	6	14	80	2,2		Uhlířová in sod., 2002	CE
a84	Afrika- Tanzanija 1	5,5	33,1	10,9	56	13,8		Sugihara in sod. 2011	ekvatorialna

se nadaljuje...

... nadaljevanje priloge A: Zbirka podatkov fizikalno-kemijskih lastnosti za 90 vzorcev različnih tal (Godicelj, 2011), dopolnjena z 9 vzorci jamskih sedimentov te študije.

		fizikalno- kemijske lastnosti tal						vir	skupina tal
simbol	vzorec	pH	G (%)	M (%)	P (%)	C(org) g/kg	N(tot) g/kg		
a85	Afrika-Tanzanija 2	6,3	4,9	3,3	91,7	5,6		Sugihara in sod. 2011	ekvatorialna
a86	Travnik barje 0-15	6,4	14,3	21,7	64	28,68		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a87	Travnik barje 15-30	6,51	17,2	15,5	67,3	24,89		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a88	Travnik barje 30-45	6,53	10,4	11	78,6	54,67		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a89	Travnik barje 45-60	6,6	8,5	11,9	79,6	52,34		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a90	Travnik barje 60-75	6,62	9,4	13,3	77,3	46,72		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a91	Pl. polje	6,5	20	51	29	10		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a92	Polje Črmošnjice	5,8	21	41,8	37,2	6,4		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a93	TerraRossa	5,83	32,6	40,2	27,2	3,1		Stres, neobjavljeni podatki	CE
a94	TerraRossa	7,7	21,2	51	27,8	1		Blažič s sod., neobj. podatki	CE
a95	Ponikva	6,8	13,7	27,7	58,6	3,1		Blažič s sod., neobj. podatki	CE
a96	Bohinj	7,14	9,4	18,1	72,5	11,1		Blažič s sod., neobj. podatki	CE
a97	Grosuplje	6,2	20,1	46,3	3,6	3,3		Blažič s sod., neobj. podatki	CE
a98	N.Gorica	6	18	4,5	37	2,7		Blažič s sod., neobj. podatki	CE
a99	R.na Koroškem	6,2	11,2	21,9	66,9	4,2		Blažič s sod., neobj. podatki	CE

*CE- Centralno- evropska tla