

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nejc STOPNIŠEK

NITRIFIKACIJA V KISLIH ŠOTNIH TLEH LJUBLJANSKEGA BARJA

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

NITRIFICATION IN LOW pH BOG SOIL FROM LJUBLJANA MARSH

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno deloma na Katedri za mikrobiologijo, Oddeleku za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani in deloma na Institute of Biological and Environmental Sciences, v Aberdeenu na Škotskem.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić Mulec in za recenzenta prof. dr. Gorazda Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Ines Mandić Mulec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

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

Nejc Stopnišek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24 : 631.42 (043)=163.6
KG	mikrobiologija tal/mokrišča/Ljubljansko barje/mikrobne združbe/bakterije/arheje/nitrifikacija/Crenarchaeota/krenarheje
AV	STOPNIŠEK, Nejc
SA	MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	NITRIFIKACIJA V KISLIH ŠOTNIH TLEH LJUBLJANSKEGA BARJA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 68 str., 5 pregl., 15 sl., 2 pril., 55 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	Krenarheje najdemo v najrazličnejših okoljih, od kopenskih kot morskih, kjer velikokrat številčno prekašajo bakterijske oksidatorje amonijaka, glede na številčnost kopij gena <i>amoA</i> . Gen <i>amoA</i> je ključni funkcionalni gen, ki kodira podenoto A encima amonij monooksigenaze. V tem diplomskem delu smo želeli ugotoviti zastopanost nitrifikatorjev, tako bakterijskih kot arhejskih, v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja. Aktivnost in strukturo združbe nitrifikatorjev smo pregledali z analizo genov za 16S rRNK in <i>amoA</i> . Po dvajsetih dnevih inkubacije smo izmerili visoko stopnjo nitrifikacije po dodatku različnih koncentracij amonija (NH_4^+ -N). Filogenetska analiza narejena na podlagi analize arhejskih genov za 16S rRNK je pokazala visoko diverziteto znotraj debla Crenarchaeota, znotraj katere pa sta dominantni skupni Crenarchaeota 1.1c in 1.3. Profili arhejskih <i>amoA</i> genskih transkriptov, pridobljeni z metodo denaturacijske gradientne gelske elektroforeze, so pokazali spremembo v sestavi združbe arhejskih oksidatorjev amonijaka med inkubacijo, ne pa pri bakterijah. Te rezultate smo dodatno podkrepili z kvantitativno metodo PCR, ki je pokazala rast arhejskih oksidatorjev amonijaka. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko trdimo, da so krenarheje dominantni oksidatorji amonijaka v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24 : 631.42 (043)=163.6
 CX soil microbiology/peatlands/Ljubljansko barje/microbial communities/bacteria/archaea/nitrification/Crenarchaeota/crenarchaea
 AU STOPNIŠEK, Nejc
 AA MANDIĆ-MULEC, Ines (supervisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
 PY 2009
 TI NITRIFICATION IN LOW pH BOG SOIL FROM LJUBLJANA MARSH
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XI, 68 p., 5 tab., 15 fig., 2 ann., 55 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Crenarchaeota are found in marine and terrestrial environments where they frequently outnumber bacterial ammonia oxidisers, in terms of abundances of *amoA* gene, a key functional gene that encodes ammonia monooxygenase subunit A. This study aimed to determine the relative importance of crenarchaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrification in an acidic forest peat soil from Ljubljana marsh, Slovenia. The activity and structure of ammonia-oxidiser microbial communities were determined by analysis of 16S rRNA and *amoA* genes. High rates of nitrification were observed in soil microcosms during incubation for 20 days after addition of different concentrations of ammonia. Phylogenetic analysis, based on archaeal 16S rRNA genes, showed high diversity among crenarchaea, with two dominant clades belonging to Crenarchaeota groups 1.1c and 1.3. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *amoA* gene transcripts demonstrated changes in the community structure of ammonia oxidising crenarchaea, but not bacteria, during incubation, providing evidence of nitrification activity of particular phylotypes. Furthermore, RT-PCR quantification of crenarchaeal *amoA* demonstrated crenarchaeal, but not bacterial ammonia oxidiser growth. Thus, our findings suggest that crenarchaea dominate ammonia oxidation in this acidic soil.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
PRILOGE	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 PESTROST BAKTERIJ IN ARHEJ	3
2.2 GLOBALNI DUŠIKOV KROG.....	6
2.2.1 Nitrifikacija in vloga prokariontov	7
2.2.2 Proteobakterijski oksidatorji amonijaka (AOB)	9
2.2.3 Planktomicete, ki oksidirajo amonij	11
2.2.4 Arheje, ki oksidirajo amonijak (AOA)	12
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Vzorčno mesto in vzorčenje	19
3.2.2 Opis mikrokozmov.....	20
3.2.2.1 Priprava mikrokozmov za ugotavljanje nitrifikacijske kinetike z acetilenom ...	21
3.2.2.2 Priprava mikrokozmov za molekularne študije	21
3.2.2.3 Priprava mikrokozmov za stabilno izotopsko sondiranje (SIP)	22
3.2.3 Ugotavljanje vsebnosti vode (VL) in sposobnost tal za zadrževanje vode (WHC).....	23
3.2.4 Merjenje $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}$ v tleh mikrokozmov.....	24
3.2.5 Izolacija nukleinskih kislin	25
3.2.6 Priprava komplementarne DNK (cDNK).....	26
3.2.7 Pomnoževanje genov za 16S rRNK in <i>amoA</i> in njihovih reverznih prepisov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) za denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE)	27
3.2.8 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE).....	29
3.2.9 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) 16S rRNK in <i>amoA</i> genov	30
3.2.10 Stabilno izotopsko sondiranje (SIP).....	32
3.2.10.1 Ultracentrifugiranje in frakcionacija DNK izolirane iz tal mikrokozmov za SIP	32
3.2.11 Kloniranje in analiza sekvenc genov za 16S rRNK in <i>amoA</i>	34
3.2.12 Statistična analiza podatkov	35
4 REZULTATI.....	36
4.1 NITRIFIKACIJSKA KINETIKA IN ACETILENSKI POSKUS	36
4.2 MOLEKULARNE ŠTUDIJE	38

4.2.1	Nitrifikacijska kinetika.....	38
4.2.2	Ugotavljanje vpliva inkubacije in bremenitve z amonijem na strukturo združbe AOB in AOA v talnih mikrokozmih z metodo DGGE.....	40
4.2.3	Ugotavljanje vpliva inkubacije in bremenitve z amonijem na strukturo aktivne združbe AOA v talnih mikrokozmih.....	41
4.2.4	Številčnost in aktivnost nitrifikatorjev v mikrokozemskem poskusu	43
4.2.5	Stabilno izotopsko sondiranje (SIP)	45
4.2.6	Filogenetska analiza.....	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.2	SKLEPI.....	55
6	POVZETEK	56
7	VIRI.....	58
	ZAHVALA.....	65
	PRILOGE	66

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Splošni in molekularni reagenti in proizvajalci.	16
Preglednica 2:	Založne raztopine in pufri	17
Preglednica 3:	Lastnosti kisljih šotnih tal iz Ljubljanskega barja (Ausec in sod., 2009)	19
Preglednica 4:	Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v tem diplomskem delu	28
Preglednica 5:	Program za izvedbo RT-PCR	31

KAZALO SLIK

Slika 1:	Dendogram glavnih skupin v domeni Bacteria, izrisan na podlagi odsekov 16S rRNK (Schloss in Handelsman, 2004).	4
Slika 2:	Dendogram glavnih skupin v domeni Archaea, na podlagi 16S rRNK genskih sekvenc (Schleper in sod., 2005).	5
Slika 3:	Filogenetska analiza betaproteobakterij, ki oksidirajo amonijak, narejen na podlagi 16S rRNK genskih sekvenc (Purkhold in sod., 2000).	10
Slika 4:	Primerjava regij krenarhejskega fozmidnega klona 54d9, s sekvencami iz Sargaškega morja (Treusch in sod., 2005).	12
Slika 5:	Filogenetsko drevo pripravljeno na osnovi sekvenc genov 16S rRNK povezanih z deblom Crenarchaeota (Prosser in Nicol, 2008).	13
Slika 6:	Shematska predstavitev priprave mikrokozemskih eksperimentov.	20
Slika 7:	Acetilenski poskus.	37
Slika 8:	Nitrifikacijska kinetika v mikrokozmih za molekularne študije.	39
Slika 9:	Splošni profil združbe AOA na podlagi gena <i>amoA</i> .	40

Slika 10:	Profil aktivne združbe AOA na podlagi genskega transkripta <i>amoA</i> .	42
Slika 11:	PCA narejena s programom CANOCO.	42
Slika 12:	Številčnost in aktivnost nitrifikatorjev v mikrokozemskem poskusu.	44
Slika 13:	Pregled vključevanja ^{13}C v molekulo DNK arhejskih oksidatorjev amonijaka.	45
Slika 14:	Filogenetska analiza arhejskih sekvenc 16S rRNK iz kislih šotnih tal Ljubljanskega barja.	47
Slika 15:	Filogenetska analiza krenarhejskih sekvenc <i>amoA</i> iz mikrokozemskih tal.	48

PRILOGE

Priloga A	Filogenetska analiza arhejskih 16S rRNK genskih sekvenc pridobljenih iz kisljih šotnih tal Ljubljanskega barja.	67
Priloga B	Filogenetska analiza krenarhejskih <i>amoA</i> genskih sekvenc pridobljenih iz mikrokozemskih tal.	68

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOA	arheje, ki oksidirajo amonijak
AOB	bakterije, ki oksidirajo amonijak
^{12}C	lažji ogljikov izotop
^{13}C	težji ogljikov izotop
C:N	oznaka atomskega razmerja med ogljikom in dušikom
DGGE	denaturacijska gradientna gelska elektroforeza
N	kemijska oznaka za element dušik; uporabljena v besedilu zajema vse oblike dušika, razen če ni drugače označeno
NH₃	kemijska oznaka za molekulo amonijaka
NH₄⁺	kemijska oznaka za ionizirajočo obliko molekule amonijaka (amonij)
NH₄⁺-N	v besedilu se navezuje na koncentracijo amonijskega dušika
NO₂⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrita
NO₃⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrata
(NO₂⁻+NO₃⁻)-N	v besedilu se navezuje na skupne koncentracije nitritnega in nitratnega dušika
SIP	stabilno izotopsko sondiranje
WHC	kapaciteta tal za zadrževanje vode (ang. water holding capacity)

1 UVOD

Mikrobne združbe so v skoraj vsakem kotičku Zemlje in so odgovorne za številne procese, od katerih je odvisno tudi naše preživetje. Nitrifikacija je eden izmed pomembnih procesov, ki jih vršijo mikroorganizmi in tako skrbijo za neprestano kroženje dušika v ekosistemu. Šele pred kratkim so odkrili, da so arheje iz debla Crenarchaeota sposobne avtotrofne oksidacije amonijaka in sicer so pri tej skupini arhej odkrili gene homologne genom *amo* bakterijskih oksidatorjev amonijaka. Tako se je pogled na proces nitrifikacije popolnoma spremenil, saj so prvotne raziskave ta proces pripisovale le bakterijam. Poleg tega pa so novejša raziskava pokazale, da so arheje, ki nosijo gen *amoA* in imajo potencial za oksidacijo amonija (AOA) v večini ekosistemov tudi precej številčnejše od bakterij. Krenarheje so s tem pridobile ekološko vlogo, ki je še slabo raziskana. Prepoznavanje funkcij krenarhej in njihovega odzivanja na različne okoljske dejavnike lahko pomembno prispeva k spoznavanju njihove vloge v okolju.

Ljubljansko barje, ki se razprostira v osrednji Sloveniji na površini 160 km², je največje mokrišče v Sloveniji. Na Ljubljanskem barju najdemo oba tipa barij, ti. nizko (fen) in visoko (bog) barje. Visoko barje je še posebej zanimiv tip, saj ima poleg visoke kapacitete za zadrževanje vode, visoke vsebnosti organske snovi in nizke specifične gostote tudi nizek pH (pH 4,3), ki je znan kot okoljski dejavnik, ki negativno vpliva na nitrifikacijo.

Na barjanskih tleh je narejenih že kar nekaj raziskav, ki so ponudile vpogled v bakterijske združbe in v novejšem času tudi v sestavo in aktivnost metanogenih arhej, ki prispevajo k globalnim izpustom toplogrednih plinov. Vendar pa je nitrifikacija v šotnih tleh slabo raziskana, še manj pa je znanega o arhejskih združbah, ki jih povezujemo z oksidacijo amonijaka v kislih šotnih tleh.

1.1 NAMEN

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti z molekularnimi metodami, relativni doprinos AOA in AOB k nitrifikacijski aktivnosti v kisljih šotnih tleh Ljubljanskega barja ter preveriti vpliv bremenitve tal z amonijskim dušikom ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) na sestavo, številčnost in aktivnost nitrifikatorske združbe bakterij (AOB) in arhej (AOA) v teh tleh. Specifični cilji diplomske naloge so bili:

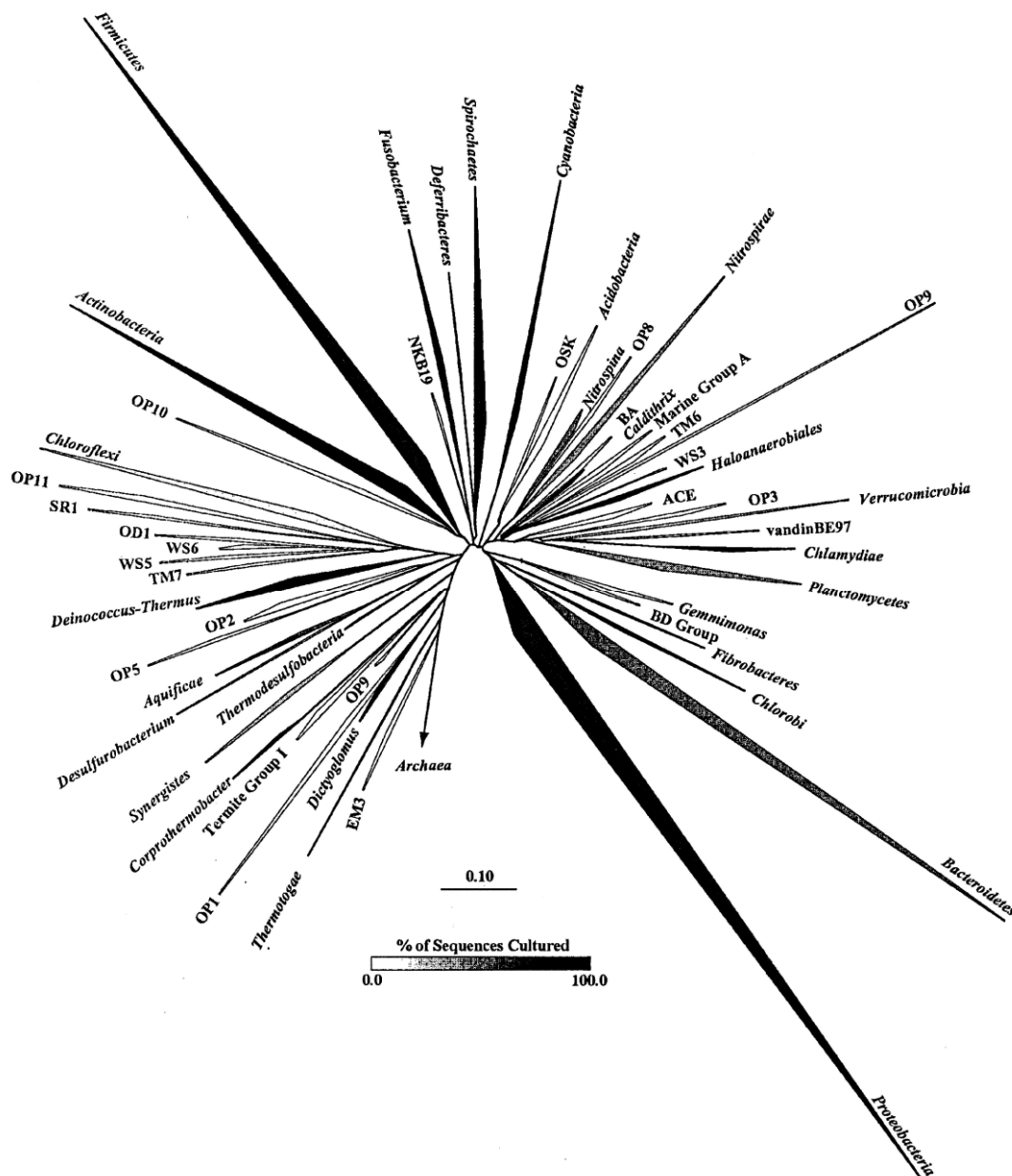
- S spremljanjem koncentracij nitritnega in nitratnega dušika v talnih mikrokozmi ovrednotiti hitrost nitrifikacije.
- Z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo markerskih genov za 16S rRNK oziroma *amoA*, ugotoviti vpliv bremenitve tal z amonijskim dušikom na sestavo aktivne združbe AOB in AOA.
- Z metodo PCR v realnem času ugotoviti številčnost AOA in AOB v tleh mikrokozmov.
- S stabilnim izotopskim sondiranjem dodatno potrditi avtotrofno oksidacijo amonijaka v kisljih tleh Ljubljanskega barja.
- S pripravo in analizo knjižnice arhejskih genov za 16S rRNK in *amoA* pridobiti vpogled v filogenetsko sestavo arhej in funkcionalno sestavo AOA v kisljih tleh Ljubljanskega barja.

2 PREGLED OBJAV

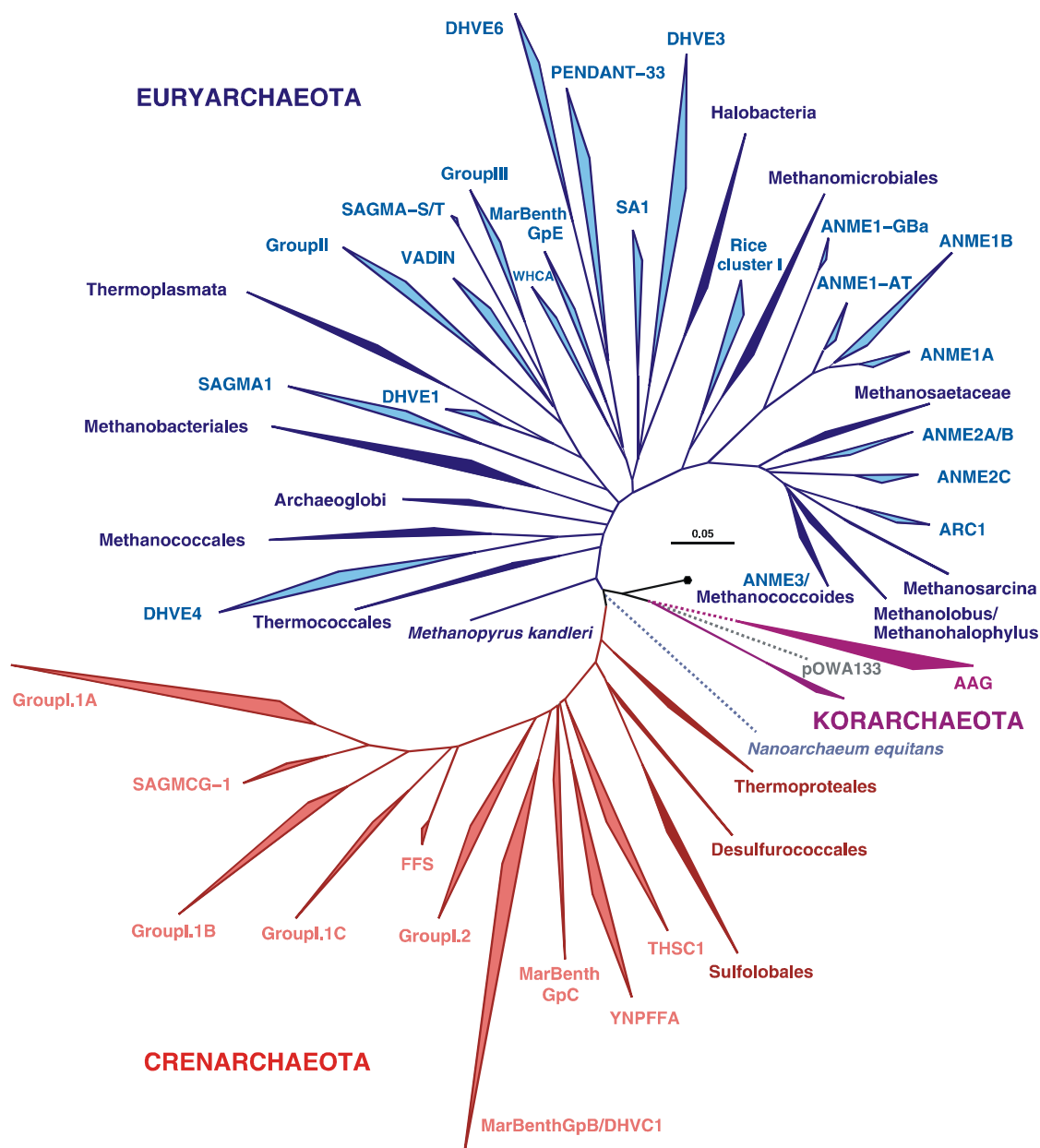
2.1 PESTROST BAKTERIJ IN ARHEJ

Molekularni preboj v mikrobni ekologiji je predstavljala objava univerzalnega drevesa življenja, ki ga je predstavil leta 1987 Carl Woese. Za konstrukcijo filogenetskega drevesa je uporabil sekvence genov za malo podenoto rRNK (16S za prokarionte in 18S za evkarionte), ki mu je služila kot splošni evolucijski marker. Na podlagi analize sekvenc genov za 16S rRNK že gojenih bakterij, je razvrstil bakterije v 10 debel. Raziskave, kjer so pridobili dodatne sekvence 16S rRNK, ne le iz gojenih mikroorganizmov, ampak tudi iz okoljskih vzorcev, so pokazale, da so mikrobne združbe veliko bolj kompleksne in raznolike, kot se je sprva predvidevalo. Danes domena Bacteria vsebuje vsaj 52 glavnih debel in polovica teh nima nobenega gojenega predstavnika (Schloss in Handelsman, 2004) (Slika 1).

Domena Archaea predstavlja tretjo vejo v drevesu življenja in je popolnoma drugačna od ostalih dveh (Woese, 1987, Woese in sod., 1990). Domena vsebuje dve glavni debli, in sicer Crenarchaeota in Euryarchaeota, ter manjšo deblo imenovano Korarchaeota, ki pa še ni splošno priznано. Na začetku, ko je Woese šele objavil drevo življenja, je veljalo, da so predstavniki domene Archaea povezani z ekstremnimi okolji, vendar pa so novejša raziskava pokazale, da so Archaea zelo številčna in raznolika skupina in jih najdemo v različnih okoljih (Schleper in sod., 2005) (Slika 2). Brochier-Armanet in sodelavci (2008) predlagajo poleg debela Crenarchaeota in Euryarchaeota še novo deblo, ki so ga poimenovali Thaumarchaeota. Do tega spoznanja so prišli s filogenetsko analizo genov za 16S rRNK in genov *amoA* krenarheje *Cenarchaeum symbiosum* in njenih sorodnikov, pri kateri so opazili, da se skupina, večinoma mezofilnih krenarhej, združuje v eno skupino.



Slika 1: Dendrogram glavnih skupin v domeni Bacteria, izrisan na podlagi odsekov genov 16S rRNK. Debelina vej označuje število sekvenc znotraj posameznega debla, dolžina trikotnika pa predstavlja razpon razvejanosti v posameznem deblu. Temnejša barva trikotnikov je v skladu z večjim številom gojenih predstavnikov znotraj prikazanega debla (Schloss in Handelsman, 2004).



Slika 2: Dendrogram glavnih skupin v domeni Archaea, na podlagi sekvenc 16S rRNK. Skupine, ki imajo gojene predstavnike, so temneje obarvane; skupine, ki jih predstavljajo le sekvence 16S rRNK izolirane iz okolja, so obarvane svetleje. Velikost trikotnikov predstavlja število predstavnikov (sekvenc). Črna točka v sredini, označuje začetek koreninjenja na podlagi domene Bacteria (Schleper in sod., 2005).

2.2 GLOBALNI DUŠIKOV KROG

Dušik sestavlja 78% zemeljske atmosfere in je osnovna komponenta vseh proteinov in nukleinskih kislin. Dušik neprestano kroži med okoljem in živimi organizmi, pri čemer je podvržen različnim oksidacijsko redukcijskim procesom, ki jih vršijo različni mikroorganizmi. Prosti dušik je izrednega pomena za delovanje vsakega ekosistema, saj določa populacijsko dinamiko vseh živih organizmov, sodeluje pri rastlinski produkciji in vpliva na kroženje ogljika ter ostalih talnih mineralov.

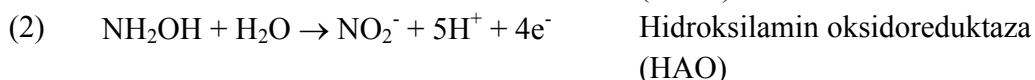
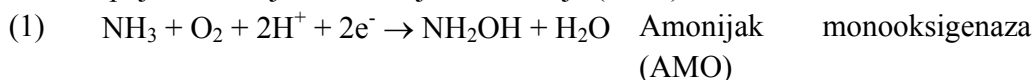
V preteklem stoletju se je vnos dušika v tla zaradi človeškega vpliva podvojil in še zmeraj narašča. Posledice prevelikega vnosa so lahko dramatične, saj se s tem zvišujejo koncentracije toplogrednega plina didušikovega oksida (N_2O), prihaja do zakisanja okolja in onesnaževanja podtalnice zaradi kopičenja nitrata, kar lahko vodi do eutrofikacije površinskih voda. Poleg tega prekomeren vnos dušika pripomore k izgubi hranil, kot sta kalcij in fosfor (Vitousek in sod., 1997). Tilman in sodelavci (2001) predvidevajo, da se bo zaradi zviševanja vnosa dušika v okolje v nadaljnjih petdesetih letih biodiverziteta posameznih vrst v morskih in v kopenskih ekosistemih drastično zmanjšala. Zato je razumevanje fiziologije in ekološke vloge mikrobnih združb, povezanih z neposredno transformacijo dušika, in razumevanje interakcij med različnimi skupnostmi (npr. interakcije med posameznimi vrstami, interakcije med mikrobnimi združbami ali interakcije med mikrobnimi, rastlinskimi in živalskimi združbami), del širšega prizadevanja za razumevanje posledic globalnih sprememb, ki lahko dramatično vplivajo na življenje na Zemlji.

2.2.1 Nitrifikacija in vloga prokariontov

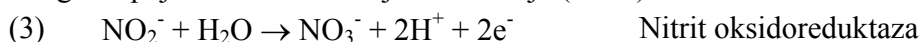
Nitrifikacija igra pomembno vlogo v globalnem kroženju dušika in temelji na oksidaciji amonijaka, ki se sprošča pri amonifikaciji. Oksidacija amonijaka vodi do nastanka nitrata, ki predstavlja substrat za denitrifikacijo.

Nitrifikacija je dvostopenjski proces, pri katerem sodelujejo številni encimi. V prvi stopnji se amonijak (NH_3) oksidira v nitrit (NO_2^-) preko hidroksilamina (NH_2OH), kar vršijo bakterije, ki oksidirajo amonijak (AOB) (reakcija 1 in 2). V drugi stopnji se nitrit oksidira do nitrata (NO_3^-), kar vršijo bakterije, ki oksidirajo nitrit (NOB) (reakcija 3).

Prva stopnja – amonijak oksidirajoče bakterije (AOB)



Druga stopnja – nitrit oksidirajoče bakterije (NOB)



Glavni encim pri oksidaciji amonijaka je amonijak monooksigenaza (AMO), ki katalizira oksidacijo amonijaka do hidroksilamina. AMO razcepi molekulo kisika (O_2) in porabi en atom kisika za oksidacijo amonijaka, pri čemer pa drugi atom kisika reagira z vodikom in nastane voda. Elektron, ki sta pri tem potrebna, izhajata iz oksidacije hidroksilamina do nitrata.

Gena *amoA* in *amoB* kodirata dve katalitski podenoti encima AMO, pri čemer tretji gen, *amoC*, kodira dodaten membranski protein (Arp in sod., 2002). Hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO) katalizira oksidacijo hidroksilamina do nitrata, ki se nadalje oksidira do nitrata z nitrit oksidoreduktazo.

Najbolj preučena stopnja nitrifikacije je oksidacija amonijaka, torej prva stopnja nitrifikacije, saj se smatra, da je le ta limitna stopnja za hitrost (ang. rate limited step) nitrifikacije. Nitrit se namreč v naravi le redko ohranja oziroma akumulira.

Mikroorganizme, ki sodelujejo pri nitritni oksidaciji, najdemo v razredih alfa- (*Nitrobacter*), gama- (*Nitrococcus*) in delta- (*Nitrospina*) proteobakterijskega debla in v deblu *Nitrospira*.

(*Nitrospira*), (Prosser, 2007). Poleg avtotrofne nitrifikacije, poznamo tudi heterotrofno. To vršijo predvsem heterotrofe glive in bakterije, ki oksidirajo organske oblike dušika (Killham, 1986), pri tem pa ne pridobijo energije. Tako lahko aktivnost heterotrofov vpliva pri merjenju stopnje nitrifikacije in zato moramo biti pazljivi pri interpretaciji rezultatov (Prosser, 2007).

Do nedavnega so domnevali, da sodijo mikroorganizmi, ki oksidirajo amonij, filogenetsko le med bakterije, kjer jih najdemo le znotraj beta- in gama- proteobakterij. Vendar so novejša raziskava k temu dvema skupinama dodale še dve novi skupini, ki sodelujeta pri oksidaciji amonija, in sicer planktomicete in arheje, ki oksidirajo amonijak.

2.2.2 Proteobakterijski oksidatorji amonijaka (AOB)

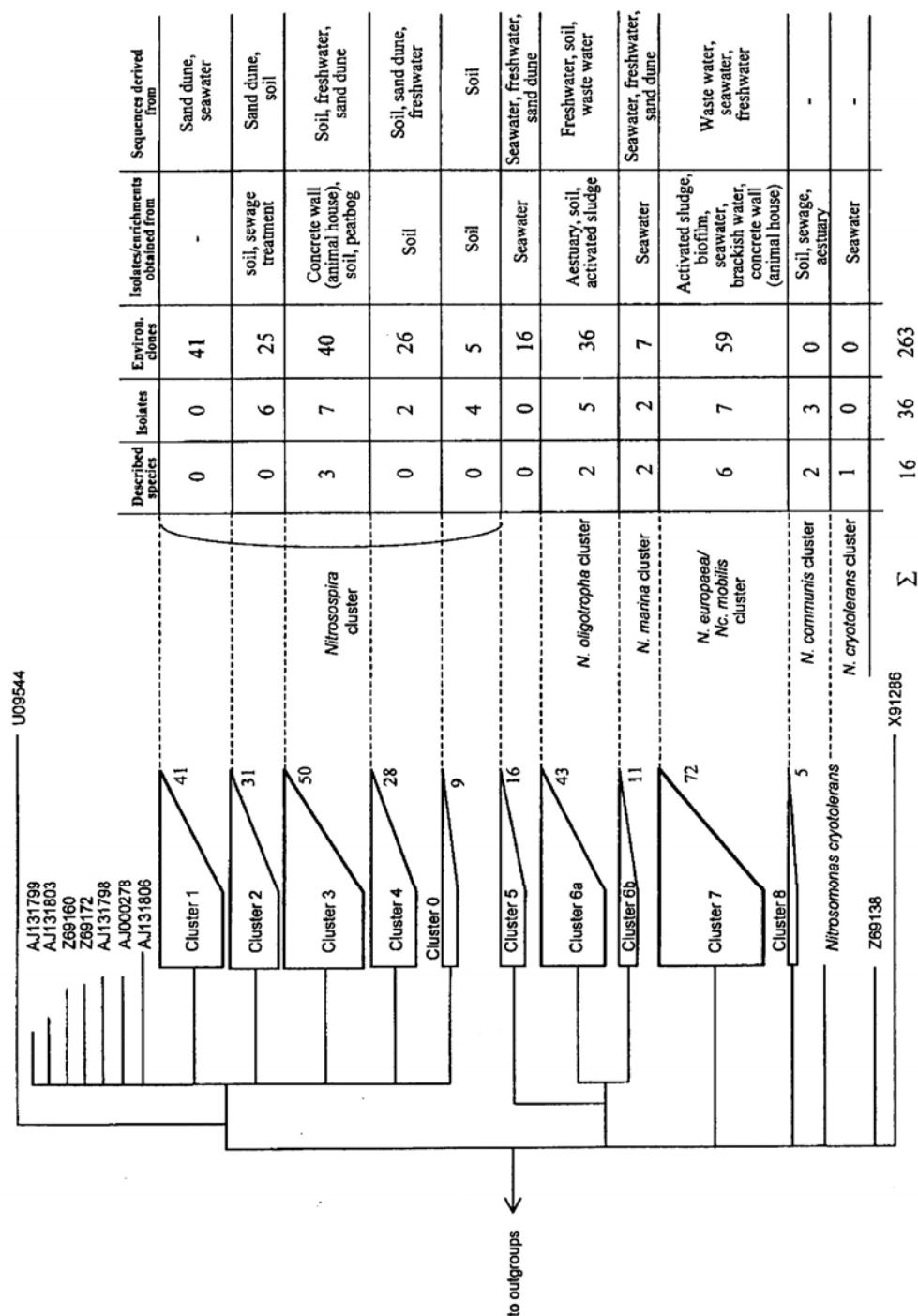
Proteobakterije, ki oksidirajo amonij (ang. ammonia oxidizing bacteria, AOB) so obligatni kemolitoavtotrofi, ki fiksirajo ogljik preko Kalvinovega cikla in uporabljajo amonijak kot vir energije. Nekateri AOB lahko uporabljajo kot vir energije tudi ureo, kar je predvsem pomembno v kisljih okoljih, kjer se amonijak pojavlja večinoma v ionski obliki, amonij (NH_4^+), le ta pa je neprimeren substrat za AMO. Pri tem naj bi urea vstopala v AOB z difuzijo in se znotrajcelično hidrolizirala do amonijaka (Jiang in Bakken, 1999; Burton in Prosser, 2001). AOB so obligatni aerobi, čeprav pa lahko nekatere vrste v anaerobnih okoljih reducirajo nitrit preko NO v N_2O in nato v N_2 , kar imenujemo nitrifikatorska denitrifikacija (Wrage in sod., 2001).

Filogenetska analiza narejena na podlagi sekvenc 16S rRNK je uvrstila vse znane AOB med beta- in gama- proteobakterije. Gamaproteobakterijska skupina AOB je v splošnem povezana z morskimi okolji in vsebuje majhno število sevov iz rodu *Nitrosococcus*, kot so *Nitrosococcus oceanus*, *Nitrosococcus halophilus*. Betaproteobakterijska skupina AOB je široko zastopana v okolju in vsebuje predstavnike rodov *Nitrosomonas* in *Nitrosospira*. K slednji sedaj prištevamo tudi seve, ki so bili včasih predstavniki rodov *Nitrosolobus* in *Nitrosovibrio* (Purkhold in sod., 2000).

Vedno večja zbirka sekvenc 16S rRNK AOB omogoča natančnejši pregled in filogenetsko analizo posameznih sevov. Tako so Stephen in sodelavci (1996) predlagali razdelitev proteobakterij, ki oksidirajo amonij, v sedem skupin. Od teh bi naj tri predstavljale rod *Nitrosomonas* in štiri rod *Nitrosospira*. Novejše raziskave (Purkhold in sod., 2000), pa predlagajo še dodatne skupine in podskupine (Slika 3). Čeprav nekatere skupine nimajo nobenega predstavnika, ki ga znamo gojiti, so njihovi genski zapisi zelo pogosto zastopani v okoljih, kar pomeni, da morajo imeti pomembno ekološko vlogo.

Stopnišek N. Nitrifikacija v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja.

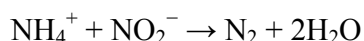
Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2009



Slika 3: Filogenetska analiza betaproteobakterij, ki oksidirajo amonijak, narejena na podlagi sekvenc 16S rRNK. Širina trapezov predstavlja število sekvenc v posamezni skupini (Purkhold in sod., 2000).

2.2.3 Planktomicete, ki oksidirajo amonij

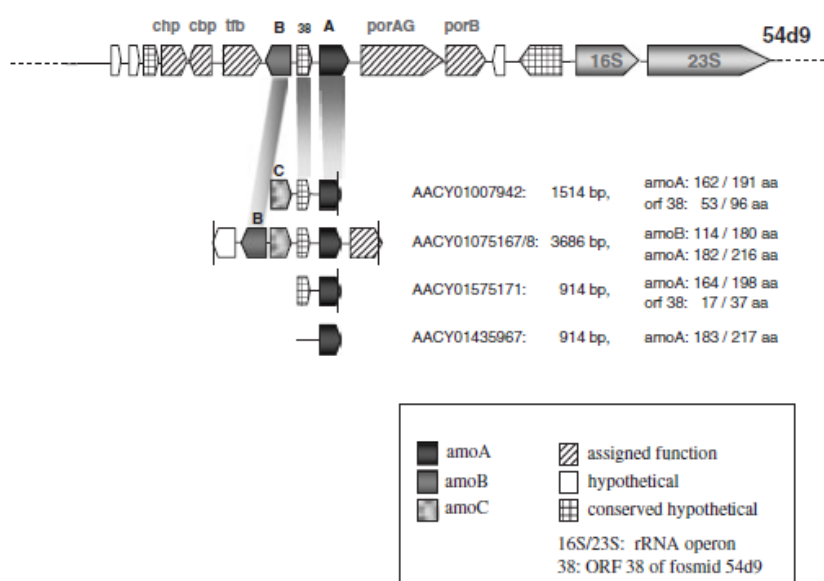
Jetten in sodelavci (1998) so odkrili, da lahko obogatena kultura iz bioreakterja, kjer predstavlja skoraj 80% vse biomase, oksidira amonijak v anaerobnih razmerah. Ta proces so poimenovali ANAMMOX (anaerobic ammonium oxidation), kjer nitrit služi kot sprejemnik elektronov,



O možnosti obstoja tega procesa iz stališča termodinamike je poročal že Broda (1977) in kasnejše raziskave so potrdile obstoj organizma, ki je odgovoren za ta proces (Strous in sod., 1999). Organizem so uvrstili v red *Planctomycetales*. Danes vse mikroorganizme povezane z ANAMMOX procesom uvrščamo v pet različnih skupin iz reda *Planctomycetales*, ki imajo status *Candidatus*. Najdemo jih večinoma v anaerobnih sedimentih in anaerobnih področjih v vodnem stolpcu, kjer naj bi bili odgovorni za 70% celotne produkcije N_2 (Op den Camp in sod., 2007), a ne v vseh okoljih (Ward in sod., 2009). O bakterijah povezanih z ANAMMOX v tleh še niso poročali.

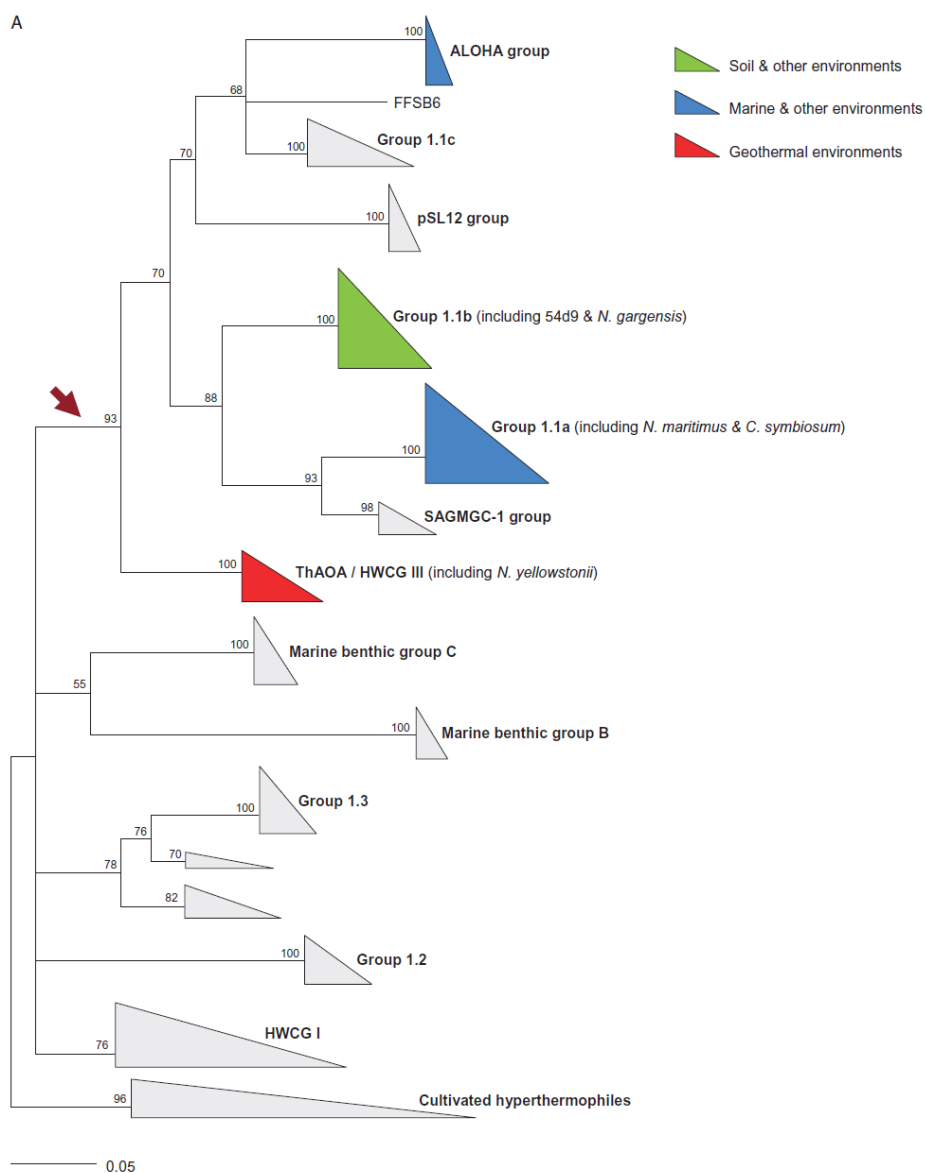
2.2.4 Arheje, ki oksidirajo amonijak (AOA)

Z metagenomsko študijo, so Treusch in sodelavci (2005) dokazali obstoj arhej, ki so zmožne oksidacije amonijaka. V tej študiji so v fosmidnem klonu ob sekvenci, ki kodira gen 16S rRNK mezofilne talne krenarheje odkrili homologe bakterijskih genov *amoA* in *amoB*, ki kodirajo podenoti amonij monooksigenaze. Ta klon so poimenovali 54d9. Podobno so v metagenomski študiji Sargaškega morja odkrili Venter in sodelavci (2004), ki so v genomskem fragmentu arhejskega izvora identificirali gene podobne *amoA*.



Slika 4: Primerjava regij krenarhejskega fosmidnega klona 54d9, s sekvencami iz Sargaškega morja (označeni z AACY). Primerjave identičnih aminokislinskih ostankov povezanih z *amo*-podobnimi geni med talnim klonom 54d9 in fragmenti iz Sargaškega morja so predstavljene desno ob sekvencah Sargaškega morja (po Treusch in sod., 2005).

Tem odkritjem je sledila osamitev prve arheje zmožne oksidacije amonijaka, t.j. vrste *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke in sod., 2005). *N. maritimus* so izolirali iz morskega akvarija in jo z filogenetsko analizo na podlagi gena za 16S rRNK uvrstili v skupino 1.1a debla Crenarchaeota, ki je pogosto povezana z morskimi okolji (Slika 5) (Nicol in Schleper, 2006).



Slika 5: Filogenetsko drevo na podlagi sekvenc genov za 16S rRNK arhej iz debla Crenarchaeota. Višina in dolžina posameznih trikotnikov predstavlja število in največjo razdaljo vej znotraj linij. Linije s predstavniki, za katere je bilo dokazano, da vsebujejo krenarhejske gene *amo*, so označene z rdečo puščico in nakazujejo na monofiletski izvor AOA (po Prosser in Nicol, 2008).

Izolat vrste *N. maritimus* vsebuje homologe bakterijskih genov *amoA*, *amoB* in *amoC*, ki kodirajo amonijak monooksigenazo, in raste z aerobno oksidacijo amonijaka do nitrita. Oksidacijo amonijaka vrši v odsotnosti organskega ogljika, kar nakazuje na fiksacijo ogljika, ki je anorganskega izvora. Zato *N. maritimus* uvrščamo med kemolitoavtotrofe, tako kot bakterije, ki oksidirajo amonijak. Ob opazovanju rasti te arheje so ugotovili, da lahko zraste do maksimalne gostote približno 10^7 celic ml^{-1} pri 28 °C v gojišču, ki vsebuje 500 μM amonija, podobno, kot je značilno za AOB.

Nadaljnje raziskave so pokazale široko zastopanost in pestrost arhejskih genov *amoA* tako v morskih kot v kopenskih okoljih. Francis in sodelavci (2005) so zbrali 377 arhejskih sekvenc genov *amoA* iz osmih geografskih področij, večinoma iz vodnega stolpca in sedimentov. Filogenetska analiza teh sekvenc je pokazala, da se sekvence združujejo v skupine glede na habitate, kjer so bile odkrite. Ti rezultati kažejo, da so arheje široko zastopane v morskih okoljih in da med njimi prihaja tudi do geografsko-ekološke diferenciacije.

Poleg tega, da so arheje zelo zastopane v različnih okoljih, so s kvantificiranjem bakterijskih in arhejskih genov *amoA* ugotovili, da je v Severnem morju zastopanost arhejskih genov *amoA* ena do dva-krat večja od bakterijskih (Wuchter in sod. 2006). Raziskava, ki je vključevala večkratno vzorčenje vodnega stolpca Severnega morja je pokazala, da število arhejskih genov *amoA* pozitivno korelira s porabo amonija, kar je potrdilo povezavo zastopanosti genov *amoA* in nitrifikacijsko kinetiko.

Porazdelitev AOA v kopenskih okoljih je manj raziskana, k čemur nedvomno prispeva kompleksnost tal in težavno izolacijo dovolj kvalitetnih nukleinskih kislin iz talnih vzorcev. Leininger in sodelavci (2006) so med prvimi naredili raziskavo na talnih vzorcih. Uporabili so 12 tipov kmetijsko obdelovanih tal iz treh različnih klimatskih pasov in preučevali zastopanost bakterijskih in arhejskih genov *amoA*. Ugotovili so da so v vseh talnih vzorcih arhejski geni *amoA* zastopani v višjem številu (tudi do 3000 krat) kot pa bakterijski geni *amoA*. Nato so izvedli še kvantifikacijo transkriptov *amoA* in ugotovili, da je število proporcionalno z vsebnostjo gena, kar kaže na ekspresijo *amoA* v arhejskih združbah. Podatki teh raziskav kažejo, da so AOA v različnih okoljih lahko številčno bolj zastopani kot AOB, kar kaže na pomembno ekološko vlogo AOA pri globalni oksidaciji amonijaka. Vendar pa je prezgodaj

predlagati splošne zaključke, saj je potrebno najprej ugotoviti prispevek AOA in AOB h kroženju dušika na globalni ravni. Nadaljnja spoznanja o relativni zastopanosti in aktivnosti AOA in AOB v različnih okoljih in o vplivu dejavnikov okolja na strukturo združb AOB in AOA so potrebna za boljše razumevanje nitrifikacije in kroženja dušika.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Preglednica 1: Splošni in molekularni reagenti in proizvajalci.

Reagenti	Proizvajalec
splošni laboratorijski material	BDH-Merck, Leicestershire, UK Fisher Scientific, Leicestershire, UK Oxoid, Hampshire, UK Sigma-Aldrich, Dorset, UK
večnamenska agaroz DNK polimeraza BIOPRO deoksiribonukleotidi (dATP, dTTP, dGTP in dCTP) lestvica DNK HyperLadder I size and mass kompetentne celice <i>E. coli</i> , α -Select Gold efficiency	Bioline, London, UK
pGEM-T easy vektor Dnaza RQ1	Promega Ltd., Southampton, UK
sintetični oligonukleotidi vektorski začetni oligonukleotidi SP6 in T7	Thermo Electron Corporation, Ulm, Germany
reverzna transkriptaza Superscript RNaza H naključni heksamerni oligonukleotidi	Invitrogen, Paisley, UK
T4 gene 32 protein	USB corporation, Ohio, USA
ampicilin bromo-kloro-indolil-galaktopiranozid (X-Gal) isopropil β -D-1-thiogalaktopiranozid (IPTG)	Melford, Suffolk, UK

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1. Splošni in molekularni reagenti in proizvajalci.

Reagenti	Proizvajalec
NucleoSpin Extract II (DNA purification Kit)	Macherey-Nagel, Düren, Germany
Qiagen® RNA/DNA purification kit	Qiagen, West Sussex, UK
SYBRTM Green	BioProducts, Rockland, USA
GelBond PAG film za poliakrilamidne gele	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden
mikrocentrifugirke Quick-Seal polyallomer	Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA

Preglednica 2: Založne raztopine in pufri.

Pufer	Sestava in hranjenje pufra
tris-acetatni pufer (TAE) 50×	242 g Tris; 57,1 ml očetna kislina; 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8); dH ₂ O do 1 L
nanašalni pufer 6x	Bromophenol blue 0,25% ; ksilen cianol (xylene cyanol) 0,25%; glicerol 30% (hranjenje pri 4°C)
akrilamidna raztopina (0% denaturanta)	2 ml 50× TAE; 20 ml 40% 37:1 akrilamid- bisakrilamid; dH ₂ O do 100 ml (hranjenje v temnem prostoru pri 4°C do največ 2 mesecev)
akrilamidna raztopina (80% denaturanta)	2 ml 50× TAE; 20 ml 40% 37:1 akrilamid- bisakrilamid; 14 ml formamida; 14,7 g uree; dH ₂ O do 100 ml (hranjenje v temnem prostoru pri 4°C do največ 2 mesecev)
raztopina za stabilizacijo (za DGGE)	100 ml etanola; 5 ml očetne kisline; 895 ml dH ₂ O
raztopina srebrovega nitrata (za DGGE)	0,1% (w/v) srebrovega nitrata (AgNO ₃) v raztopino za stabilizacijo

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 2. Založne raztopine in pufri

Pufer	Sestava in hranjenje pufra
razvijalna raztopina (za DGGE)	6 g NaOH; 2,7 ml 40% formaldehne raztopine; dH ₂ O do 200 ml
5% CTAB/fosfatni pufer za ekstrakcijo	(a) 10% CTAB v 0,7 M NaCl, (b) 240 mM fosfatnega pufra (pH 8) v razmerju 1:1 (a:b)
PEG (polietilen glikol)	30% PEG 6000 v 1,6 M NaCl
Tris EDTA (TE) pH 8	10 mM Tris-Cl (pH 8) ; 1 mM EDTA (pH 8)
CsCl v TE (pH 8)	Približno 1,27 g CsCl na ml TE (pH 8) (prilagoditi do refrakcijskega indeksa 1,398)
ampicilin	50 mg ml ⁻¹ ampicilina v dH ₂ O (sterilizirano preko filtra)
IPTG	24 mg ml ⁻¹ isopropil-β-D-thiogalaktozid (IPTG) v dH ₂ O (sterilizirano preko filtra)
X-GAL	50 mg ml ⁻¹ 5-bromo-4-klor-3-indolil-β-D- galaktopiranidoza (X-GAL) v N, N'-dimetil formamidu (sterilizacija preko filtra)

3.2 METODE

3.2.1 Vzorčno mesto in vzorčenje

Vzorčili smo gozdna tla na Ljubljanskem barju in sicer v območju t.i. Kozlarjeve gošče, ki predstavlja ostanek visokega barja. Ta gozdnati predel Ljubljanskega barja v veliki meri prekriva iglasti gozd, tla so kislja (pH 4,3) z visoko vsebnostjo organskega ogljika (45,4%) (povzeto po Ausec in sodelavci, 2009) (Preglednica 3).

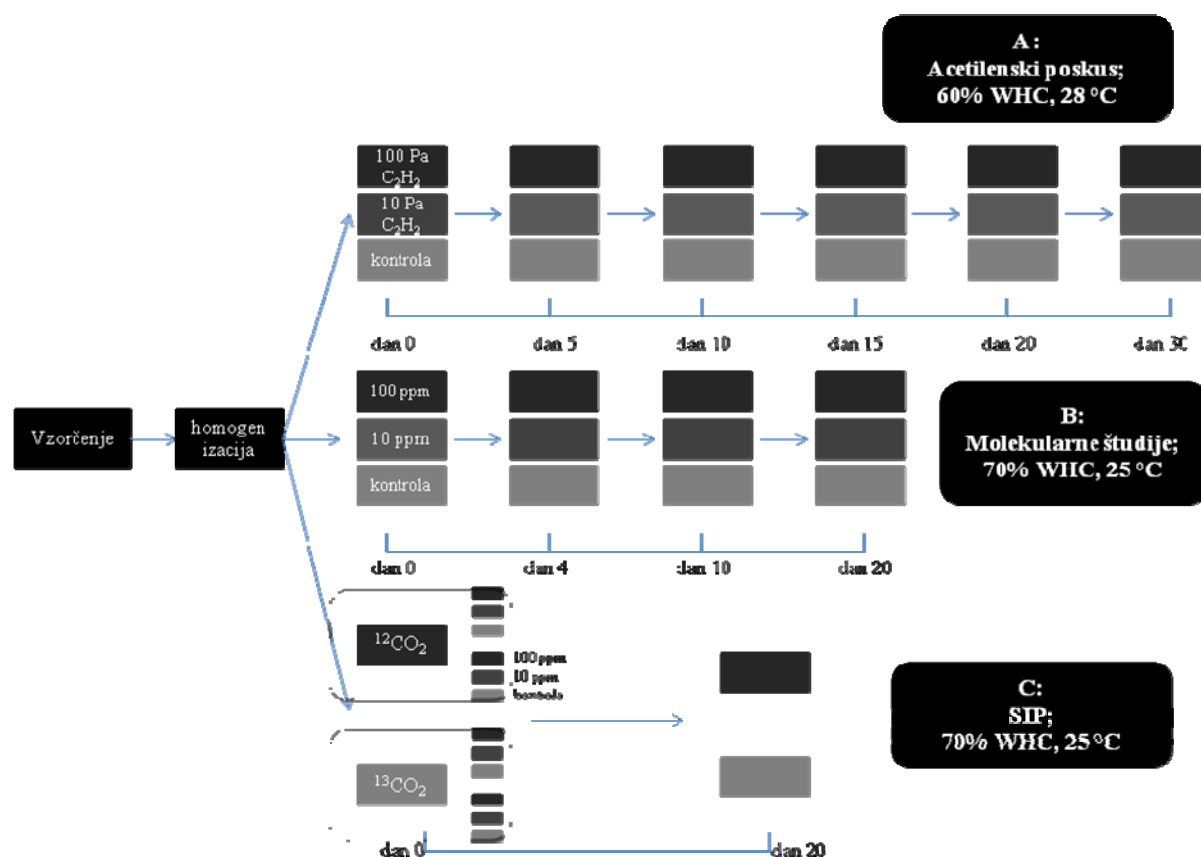
Preglednica 3: Lastnosti kisljih šotnih tal iz Ljubljanskega barja (Ausec in sod., 2009). Vrednosti predstavljajo povprečno vrednost $\pm$ standardna deviacija.

Vsebnost organskega ogljika (%)	45.4 ± 0.21
Vsebnost organskega dušika (%)	2.75 ± 0.01
Razmerje C:N	16.5 ± 0.01
WHC (g H ₂ O / g tal)	8.14 ± 0.29
Gostota tal (g cm ⁻³)	0.16 ± 0.05
Povprečna letna T (°C)	12.6 ± 10.2
Povprečna letna višina vodnega stolpca (cm)	-24.4 ± 13.8

Tla smo vzorčili dvakrat in sicer v septembru (2008) in februarju (2009). Zgornjih 30 cm tal smo vzorčili s pomočjo vzorčne sonde premera 5 cm na razdalji 30 cm in shranili v sterilne vrečke. V laboratoriju smo takoj po vzorčenju tla homogenizirali s sejanjem skozi sito (premer por 8 mm) in jih shranili pri 4 °C do uporabe. Izmerili smo tudi pH, ki je znašal v septembru 4,12 oziroma 3,96 v februarju.

Homogenizirana tla za pripravo talnih mikrokozmov smo združili (Slika 6). Za pripravo knjižnice genov arhejske 16S rRNK smo uporabili homogenizirana tla treh ločenih vzorcev, za pripravo knjižnice genov krearhejske amoA, pa smo uporabili tla iz posameznih mikrokozmov.

3.2.2 Opis mikrokozmov



Slika 6: Shematska predstavitev priprave mikrokozemskih eksperimentov. Vsak kvadrat predstavlja tri ponovitve mikrokozmov. Po končani inkubaciji smo tla analizirali, kot je opisano v nadaljevanju. In sicer smo: v poskusu **A** - v tleh merili koncentracijo NH_4^+-N in $(NO_2^-+NO_3^-)-N$ ter ugotavljali hitrost nitrifikacije v mikrokozmih, v **B** - smo analizirali strukturo mikrobne združbe v odvisnosti od časa inkubacije in bremenitve z amonijem na nivoju genov 16S rRNK in *amoA* bakterij in arhej ter merili transkripcijsko aktivnost in število arhejskih genov *amoA* in v **C** - smo skušali z metodo SIP določiti (stabilno izotopsko sondiranje, ang. stable isotope probing) aktivno populacijo avtotrofnih arhej, ki oksidirajo amonij.

3.2.2.1 Priprava mikrokozmov za ugotavljanje nitrifikacijske kinetike z acetilenom

Hitrost nitrifikacije v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja smo ugotavljali v talnih mikrokozmih in sicer smo primerjali nitrifikacijo v talnih mikrokozmih, ki smo jih izpostavili različnim koncentracijam acetilena (C_2H_2), 100 Pa (0,1%) in 10 Pa (0,01%), ki inhibira nitrifikacijo (Bateman in Baggs, 2005), ter aktivnosti primerjali s tistimi, ki smo jih izmerili v mikrokozmih, ki niso bili izpostavljeni acetilenu. Poskus je trajal 30 dni pri 28 °C pri čemer smo vzorčili prvi dan (dan 0) in nato na dan 5, 10, 15, 20 in 30. V 300 ml stekleničke smo zatehtali 10 g tal, dovlačili s sterilno destilirano vodo do vlažnosti tal 60% WHC in jih zaprli z zamaški iz butilne gume, s čimer smo se izognili nenadzorovani izgubi C_2H_2 in izmenjavi zraka. K tlom v stekleničkah smo dodali že navedeni količini acetilena s pomočjo brizge. Za lažje delo smo vnaprej pripravili dve redčitvi acetilena. In sicer smo v steklenici z volumnom 570 ml dodali aceten do koncentracije 10% oziroma 1% (ut%). Iz te predhodno pripravljene redčitve smo nato odvezemali po 3,2 ml z brizgo in dodajali posameznim mikrokozmom s čimer smo dobili 0,1% in 0,01% koncentracijo acetilena v mikrokozemski atmosferi.

V dvodnevni intervalih smo mikrokozme tehtali in dovlačevali s količino izgubljene teže prvotnih mikrokozmov, poleg tega pa smo v enakih intervalih mikrokozme prezračevali po 5 min in jim po zaprtju ponovno dodajali določeno količino C_2H_2 . S tem smo se izognili nastanku anaerobnih razmer, ki bi lahko negativno vplivale na nitrifikacijo.

3.2.2.2 Priprava mikrokozmov za molekularne študije

Za študij nitrifikatorjev v talnih vzorcih smo pripravili mikrokozemski poskus, kjer smo v 60 ml stekleničke zatehtali 10 g tal z WHC 70%. Tla smo bremenili z 0, 10 in 100 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}$ tal. Kot vir amonija smo uporabili raztopino amonijevega sulfata. Vsebnost vode v mikrokozmih smo kontrolirali z merjenjem teže v tridnevni intervalih. Ob zmanjšanju teže smo razliko v teži nadomestili s sterilno destilirano vodo. Mikrokozme smo inkubirali 20 dni pri 22 °C in vzorčili ob dnevih 0, 4, 10 in 20. Vsaka časovna točka je vsebovala tri ponovitve pri različnih bremenitvah, tj. z dodatkom ali brez dodatka $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Koncentracijo amonijskega in nitratnega dušika smo izmerili takoj po razdiranju mikrokozmov. Preostanek vzorčenih tal

smo shranjevali v PVC vrečkah pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do največ 5 dni, do izvedbe izolacije nukleinskih kislin.

3.2.2.3 Priprava mikrokozmov za stabilno izotopsko sondiranje (SIP)

SIP je metoda, ki omogoča povezavo določene encimske aktivnosti z genetskim zapisom mikroorganizma na osnovi katerega lahko sklepamo, kateri mikroorganizem to aktivnost izvaja. V diplomskem delu smo želeli z metodo SIP ugotoviti, kateri nitrifikatorji so aktivni v mikrokozmih v danih razmerah. Za izvedbo SIP smo najprej pripravili serijo mikrokozmov, za kar smo zatehtali 10 g tal v 60 ml stekleničke in tlom dodali 0, 10 in $100\text{ }\mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}\text{ tal}^{-1}$ ter inkubirali 20 dni pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mikrokozme smo pripravili v treh ponovitvah za vsako bremenitev in dodali 5% (ut%) $^{13}\text{CO}_2$ z brizgo. Prav takšno serijo mikrokozmov smo pripravili še enkrat, le da smo namesto $^{13}\text{CO}_2$ uporabili $^{12}\text{CO}_2$, ki je služil kot kontrola. Tako smo skupno pripravili 18 mikrokozmov in sicer $2\text{ (izotopni obliki CO}_2\text{)} \times 3\text{ (bremenitev z NH}_4^+\text{-N)} \times 3\text{ ponovitve}$.

Stekleničke smo v tridnevni intervalih prepilovali s svežim zrakom in nato ponovno dodajali ustrezno količino $^{13}\text{CO}_2$ in $^{12}\text{CO}_2$. Pri tem smo kontrolirali tudi vsebnost vode z merjenjem teže mikrokozmov in izgubljeno težo nadomestili z dodatkom destilirane vode.

3.2.3 Ugotavljanje vsebnosti vode (VL) in sposobnost tal za zadrževanje vode (WHC)

Za preračunavanje nitrifikacijske kinetike in preračunavanje podatkov na g tal smo morali najprej ugotoviti vsebnost vode v tleh, ki smo jo izrazili kot odstotni delež glede na celotno kapaciteto tal za zadrževanje vode oziroma % WHC. To smo naredili s 48 h sušenjem talnih vzorcev (20 g) pri 65 °C v naprej zatehtanih aluminijastih posodicah.

WHC predstavlja največjo maso vode, ki jo en gram tal lahko zadrži. V kovinske cilindre s prepustnim dnom smo dodali nekaj papirnatih brisač in vse skupaj zatehtali. Cilindre z brisačami smo nato popolnoma zmočili in ponovno izmerili težo. Takšne cilindre smo napolnili s tlemi, ki smo jim predhodno izmerili vsebnost vode (VL) in še enkrat stehali ter namakali čez noč v destilirani vodi, da so se tla popolnoma prepojila. Naslednje jutro smo cilindre s prepojenimi tlemi odcejali, pri čemer smo odcejanje spremljali z merjenjem teže. Ko se je teža ustalila smo na podlagi predhodne meritve izračunali WHC, ki je znašal 8,14 g H₂O tal⁻¹.

Na podlagi enačbe,

$$\% \text{ WHC} = (\text{VL}/\text{WHC}) \times 100\% \quad \dots (1)$$

smo izračunali %WHC za naša preiskovana tla, ki je znašal za acetilenski poskus 54% WHC in za molekularne študije 58% WHC.

3.2.4 Merjenje $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}$ v tleh mikrokozmov

V mikrokozemskih poskusih smo za ugotavljanje nitrifikacijske kinetike in za molekularne študije ob naštetih dnevih mikrokozme razdrli in izvedli ekstrakcijo tal z raztopino KCl. Za ugotavljanje nitrifikacijske kinetike smo uporabili 50 ml 2M raztopino KCl (razmerje tal in raztopine, 1:5). Ekstrahirali smo 60 minut s stresalnikom pri 250 rpm, suspenzijo centrifugirali 2 min pri 12000g in 25 °C ter odvzeli 8 ml supernatanta za nadaljnjo kolorimetrično analizo z napravo FLOW SYS, Alliance instruments (Avstrija). Vzorce smo pred analizo shranili pri 4 °C do največ 20 dni.

Za molekularne študije smo izvedli ekstrakcijo iz 4 g mikrokozemskih tal z 32 ml 1M raztopine KCl (razmerje tal in raztopine, 1:8). Tla v 50 ml falkonkah smo stresali 30 min pri 250 rpm in nato centrifugirali 2 min pri 12000g in 25 °C. Supernatant smo preko noči shranili pri 4 °C in naslednje jutro izvedli kolorimetrično analizo z napravo FIA star 5010 Analyser (Tecator, USA).

3.2.5 Izolacija nukleinskih kislin

Nukleinske kisline, tj. DNK in RNK, smo izolirali po delno spremenjenem postopku, ki ga je prvotno opisal Griffith in sodelavci (2000), spremenil pa Nicol in sodelavci (2005). V mikrocentrifugirke Blue Matrix Ribolyser, ki vsebujejo zmes keramičnih in silika delcev (Hybaid, Ashford, UK), smo zatehtali 0,5 g tal. V epice smo dodali še 0,5 ml CTAB, 0,25 ml fenola in 0,25 ml raztopine kloroform : izoamil alkohol v razmerju 24:1. Celice v zmesi tal in raztopin smo lizirali 30 s pri hitrosti 4 z napravo ThermoHybaid Ribolyser Cell Disruptor (Hybaid). Po lizaciji, smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 min pri 16,000g in 5 °C. Nastali supernatant smo prenesli v nove 1,5 ml epice in dodali 0,5 ml raztopine kloroform : izoamil alkohol v razmerju 24:1 ter mikrocentrifugirke dobro ročno premešali, da sta se pojavili lepo ločljivi in vidni fazi. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 16,000g in 5 °C in zgornjo fazo prenesli v nove 1,5 ml mikrocentrifugirke, preostanek pa zavrgli. Nukleinske kisline smo precipitirali 2 uri na ledu z dvojno količino 30% raztopino PEG (polietilen glikol). Precipitirane in na steno epice pritrjene nukleinske kisline smo po 20 min centrifugiranja pri 16,000g in 5 °C sprali z ledeno mrzlim 70% etanolom in po ponovnem centrifugiranju (20 min pri 16,000g in 5 °C) ter odstranitvi tekoče faze pustili vsebino mikrocentrifugirk sušiti na zraku. Posušeno usedlino smo na koncu resuspendirali v 30 µl sterilne vode brez RNaze in pripravili dva alikvota, za delo z DNK in delo z RNK. Alikvote za delo z DNK smo shranili pri -20 °C, alikvote za delo z RNK pa smo shranili pri -80 °C.

Za izolacijo nukleinskih kislin za pripravo knjižnice arhejskih genov za 16S rRNK smo uporabili PowerSoil komplet (MoBio, USA) in izolacijo izvedli po priloženem protokolu.

V vseh primerih smo izolirane nukleinske kisline ločili z 1% agarozno gelsko elektroforezo in barvali z etidijevim bromidom ter pregledali z UV svetlobo.

3.2.6 Priprava komplementarne DNK (cDNK)

V diplomskem delu nas je zanimala tudi aktivnost nitrifikacijske združbe, ki smo jo spremljali s kvantifikacijo RNK molekul. Za pridobitev reverznega prepisa RNK molekul (komplementarne oblike DNK (cDNK)), smo uporabili 7 µl vzorca izoliranih nukleinskih kislin, ki smo jih obdelali najprej z encimom RQ1Dnase (Promega, Southampton, UK) in nato z reverzno transkriptazo Superscript II (Invitrogen, Paisley, UK). Pri reakciji smo uporabili naključne heksamerne začetne oligonukleotide (Invitrogen) v koncentraciji 160 pmol na reakcijo po navodilih proizvajalca (Invitrogen, Paisley, UK). Izvedli smo tudi dve negativni kontrolni reakciji. Prva negativna kontrola, s katero smo preverili ali se je v prisotnosti DNaze vsa DNK razgradila v vzorcu, je vsebovala izolirano RNK in vse dodatne reagentne razen dodatka reverzne transkriptaze. Kontaminacijo s strani reagentov smo preverili z drugo negativno kontrolo, ki je vsebovala vodo namesto izoliranih molekul RNK.

3.2.7 Pomnoževanje genov za 16S rRNK in *amoA* in njihovih reverzних prepisov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) za denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE)

Strategija vstavljanja začetnih oligonukleotidov (nested PCR) je bila potrebna za pomnoževanje 16S rRNK genskih produktov za DGGE analizo teh sekvenc. Za DGGE analizo krenarhejskij sekvenc *amoA* smo uporabili produkte PCR, ki niso vsebovali GC čeljusti.

Za pomnoževanje 16S rRNK in *amoA* genov smo uporabili več kombinacij začetnih oligonukleotidov (Preglednica 4).

Za najprimernejše so se izkazali arhejski začetni oligonukleotidni pari, ki so v Preglednici 4 odebeljeno zapisani. Ostali pari so dali nespecifične produkte in smo jih zato izločili iz nabora.

Največ težav smo imeli s pomnožitvijo genov povezanih z AOB, ki jih nismo uspeli pomnožiti, kljub uporabi različnih začetnih oligonukleotidov, kot tudi uporabi različnih pogojev PCR.

Za vse reakcije PCR smo uporabili program: 5 min pri 95 °C; temu sledi 10 ciklov pri 94 °C za 30 s, 55 °C za 30 s, 72 °C za 1 min; temu sledi 25 ciklov pri 92 °C za 30 s, 55 °C za 30 s, 72 °C za 1 min; temu sledi en cikel pri 72 °C za 10 min. Za produkte ≥ 1 kb, so bili uporabljeni enaki pogoji, razen tega, da se je podaljševalni čas povečal na 2 min.

Vse produkte nastale pri PCR smo ločili z 1% agarozno gelsko elektroforezo in barvanjem z etidijevim bromidom ter pregledali z UV svetlobo.

Preglednica 4: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v diplomskem delu

Oligonukleotid	Lega	Sekvence 5' - 3'	Reference
Bakterije, 16S rRNK gen			
27f	8-27 ¹	AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG	(Lane, 1991)
1492r	1492-1514 ¹	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	(Lane, 1991)
P2	518-534 ¹	ATTACCGCGGCTGCTGG	(Muyzer in sod., 1993)
P3	341-358 ¹	GC čeljusti- CCTACGGGAGGCAGCAG	(Muyzer in sod., 1993)
AOB, 16S rRNK gen			
CTO 189f (1:1:1 of a, b and c)	189-207 ¹	(a) GGAGAAAAGCAGGGGATCG (b) GGAGGAAAGTAGGGGATCG (c) GGAGGAAAGCAGGGGATCG	(Kowalchuk in sod., 1997)
CTO 654r (1:1 of a and b)	633-654 ¹	(a) CTAGCTTTGTAGTTTCAAACGC (b) CTAGCCTTGTAGTTTCAAACGC	(Kowalchuk in sod., 1997)
AOB, amoA gen			
amoA-1F, 1F-GC	332-349 ²	GC čeljusti- GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Rotthauwe in sod., 1997)
amoA-2R	802-822 ²	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	(Rotthauwe in sod., 1997)
amoA-2R-GG	802-822 ²	CCCCTCGGGAAAGCCTTCTTC	(Nicolaisen in Ramsing, 2002)
krenarheje, 16S rRNK gen			
109f	109-125 ¹	ACKGCTCAGTAACACGT	(Großkopf in sod., 1998)
771f	753-771 ¹	ACGGTGAGGGATGAAAGCT	(Ochsenreiter in sod., 2003)
957r, 957r-GC	957-974 ¹	GC čeljusti- CGGCGTTGACTCCAATTG	(Ochsenreiter in sod., 2003)
1492r	1492-1514 ¹	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	(Lane, 1991)
krenarheje, amoA gen			
crenamoA23f	7-23 ³	ATGGTCTGGCTWAGACG	(Tournu in sod., 2008)
crenamoA616r	616-635 ³	GCCATCCATCTGTATGTCCA	(Tournu in sod., 2008)

¹ Lega glede na oštevilčenje pri *Escherichia coli* (Brosius in sod., 1981)² Lega glede na *N. europaea amoA* gen (McTavish in sod., 1993)³ Lega glede na *amoA* gen krenarhejski fozmid 54d9 (Treusch in sod., 2005)

3.2.8 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE)

Denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE) smo izvedli po postopku, ki so jih opisali Nicol in sodelavci (2005) ter Tournu in sodelavci (2008) z začetnimi oligonukleotidi specifičnimi za gene 16S rRNK in *amoA* ter analizo transkriptov obeh genov (Preglednica 4). Za DGGE analizo smo uporabili sistem DCode Universal Mutation Detection (Bio-Rad, Hertfordshire, UK). Geli so vsebovali 8% (ut%) poliakrilamida, ki smo ga polimerizirali z dodatkom 0,1% (ut%) amonijevega persulfata in 0,01% (ut%) raztopine TEMED ter gradient z 15 – 55% uree (denaturanta) za krenarhejski gen *amoA* in gradient z 35 – 75% uree za bakterijske in krenarhejske gene 16S rRNK. Za pripravo poliakrilamidnega gradientnega gela smo uporabili napravo Peristaltic pump, Miniplus3 (Gilson, France).

Za elektroforezo smo uporabili 7 L 1 × TAE pufra, segretega na konstantno temperaturo 60 °C, napetost 100 V in čas 900 min. Po končani gelski elektroforezi smo gel barvali s srebrovim nitratom (AgNO_3) (Nicol in sod., 2005). Na kratko, gel smo najprej fiksirali najmanj 30 min v 250 ml fiksirne raztopine (10% etanol in 0,5% očetna kislina) in nato gel barvali 20 min v 250 ml barvne raztopine (AgNO_3 (0,25 g) in 250 ml fiksirne raztopine). Po barvanju smo gel sprali z obilico destilirane vode in ga namakali v 250 ml razvojne raztopine (NaOH (6 g), 40% formaldehidna raztopina (2,7 ml) in 200 ml destilirane vode) toliko časa, dokler se niso pojavile dobro obarvane lise. Gel smo ponovno dobro sprali in skenirali s skenerjem Epson GT-9600 (Epson, Hemel Hempstead, UK).

Relativno inteziteto posameznih lis smo kvantificirali z programskim orodjem Phoretix 1-D (Phoretix International, Newcastle-Upon-Tyne, UK) (Nicol in sod., 2005).

3.2.9 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) 16S rRNK in *amoA* genov

Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (RT-PCR) je metoda, ki deluje na enakem principu kot običajna verižna reakcija s polimerazo. Omogoča sprotno sledenje količine nastalega produkta in je zato hitrejša, hkrati pa omogoča tudi kvantifikacijo točno določene nukleinske kisline v začetnem vzorcu. Kvantifikacija je osnovana na fluorescenci, ki je posledica nastajanja PCR produktov. To lahko dosežemo na dva načina, in sicer z uporabo označenih začetnih oligonukleotidov ali pa z uporabo barvil, ki se vključijo v dvoverižno molekulo nukleinske kisline. V našem poskusu smo uporabili barvilo SYBRTM Green, ki se vključuje v dvoverižne molekule nukleinskih kislin. Torej se z nastajanjem novih produktov PCR veča tudi fluorescenca, kar pa spremljamo z optičnim merilcem. Vrednost, ki jo pri tem dobimo nima enot oziroma jo imenujemo relativna enota. Vrednost lahko pridobimo šele, ko primerjamo rezultat z rezultatom standarda, za katerega poznamo natančno začetno koncentracijo nukleinske kisline.

Protokol, ki smo ga uporabili za kvantificiranje bakterijskega gena *amoA* je temeljil na protokolu, ki ga je opisal Offre in sodelavci (2009), protokol za kvantificiranje krenarhejskega gena *amoA* in njegovega transkripta pa je temeljil na protokolu, ki ga je opisal Nicol in sodelavci (2008). Za kvantifikacijo bakterijskega gena *amoA* in transkripta *amoA* smo uporabili začetne oligonukleotide *amoA*-1F in *amoA*-2R (Rotthauwe in sod., 1997) (Preglednica 4). Za kvantificiranje krenarhejskega gena pa smo uporabili začetne oligonukleotide *crenamoA23f* in *crenamoA616r* (Tournu in sod., 2008) (Preglednica 4). Program, ki smo ga uporabili za izvedbo RT-PCR je predstavljen v Preglednici 5.

Preglednica 5: Program za izvedbo RT-PCR

Korak	Opis koraka	Pogoji za creanamoA23f – crenamoA616r	Pogoji za amaA-1F – amaA-2R
1	Začetna denaturacija	95 °C, 5 min	95 °C, 5 min
2	Denaturacija	95 °C, 30 s	95 °C, 10 s
3	Nalaganje	60 °C, 30 s	60 °C, 30 s
4	Podaljševanje	82 °C, 5 s	81 °C, 5 s
5	Branje podatkov	Zbiranje podatkov fluorescence	
6	35 ciklov od koraka 2 - 5		
7	Končno podaljševanje	60 °C, 10 min	
8	Krivulja taljenja	72 – 95 °C, držanje temperature za 1 s na vsakih 0.2 °C	
9	Ponovno nalaganje	72 °C, 10 min	

Kot standard za bakterijski gen *amoA* smo uporabili genomsko DNK iz čiste kulture bakterije *Nitrosospira multiformis*. Iz izolirane genske DNK smo pripravili redčitveno vrsto z znano koncentracijo DNK.

Za pridobitev standarda za krenarhejski gen *amoA* smo najprej izolirali genomsko DNK krenarheje *Nitrosopumilus maritimus* iz čiste kulture. Nato smo pomnožili pomnožek genske DNK z začetnimi oligonukleotidi Nm operon F (GAA TTC GAC TTC GCC AAA AA) in Nm operon R (GAC CCA CCA TAC CAA CCA GT). Prav tako smo naredili serijo redčitev z znanimi koncentracijami DNK.

Reakcije za izvedbo RT-PCR so bile narejene v končnem volumnu 20 µl in so vsebovale:

- 0,5 µl BSA,
- 2,5 µl vsakega začetnega oligonukleotida (10 pM za arhejski gen *amoA* in 0,8 µM za bakterijski gen *amoA*),
- 12,5 µl QuantiFastTM SYBR[®] Green PCR Master Mix (Qiagen) in

5 µl izoliranih nukleinskih kislin. Pomnoževanje smo izvajali v aparatu DNA Engine OPTICON 2 System (MJ Research) in končne produkte preverili še dodatno z 1% agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.10 Stabilno izotopsko sondiranje (SIP)

Kot že omenjeno v poglavju 3.2.2.3, smo metodo SIP uporabili za ugotavljanje avtotrofne inkorporacije ^{13}C v molekule DNK. Ker so koncentracije označenega substrata, ki ga uporabljamo, običajno majhne, se poleg težjega izotopa v molekule vključujejo tudi lažje vrste. Zato je potrebno ob izvajanju poskusa izvesti še dodaten set kontrolnih poskusov, v katerih vzorcev ne bremenimo s težkim izotopom in le te nato primerjamo z bremenjenimi vzorci, seveda v isti časovni točki.

Z izolacijo biomarkerja in dodatnih analiz ugotovimo inkorporacijo substrata. Biomarkerji, v katere se vključi s ^{13}C označen substrat in so zanimivi za analizo, so membranski lipidi (predvsem fosfolipidi (PLFA)), molekule DNK in RNK. Vendar pa ima SIP, kot tudi vsaka druga metoda, nekaj slabosti, na katere moramo biti pozorni. Prva je v prehranjevalni verigi, kjer lahko prihaja do prenosov označenega substrata preko primarnih na sekundarne porabnike ali obratno. Ta vpliv lahko minimaliziramo s spremljanjem dinamike združbe na posameznih časovnih točkah v času inkubacije. Drugo slabost, ki je pomembnejša, pa predstavlja koncentracija ^{13}C , ki je potrebna za inkorporacijo in vizualizacijo. Ta mora biti ponavadi zelo visoka, čeprav naj bi za optimalno DNK-SIP uporabili tolikšno koncentracijo substrata, kot ga najdemo tudi v okolju iz katerega je bil vzorec odvzet. V primeru tal pomeni, da je idealna koncentracija ^{13}C do 5%, saj so koncentracije CO_2 v tleh tipično med 1 in 5% (Neufeld in sod., 2006).

3.2.10.1 Ultracentrifugiranje in frakcionacija DNK izolirane iz tal mikrokozmov za SIP

Iz tal mikrokozmov smo po dvajsetih dneh inkubacije izolirali skupne nukleinske kisline (glej poglavje 3.2.5) in jih shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do uporabe.

Izolaciji nukleinskih kislin je sledilo ultracentrifugiranje DNK v gostotnem gradientu cezijevega klorida (CsCl) (Freitag in sod., 2006). In sicer smo v 5,1 ml mikrocentrifugirke Quick-Seal polyallomer (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA) dodali raztopino CsCl v TE pufu (pH 8), ki smo jo predhodno umerili z ročnim refraktometrom ATAGO-R-5000 (UNI-IT

Inc., Tokyo, Japan) in prilagodili do refraktometerskega indeksa (RI) 1,3999 (1,69985 g ml⁻¹ tekočinske gostote) z dodajanjem CsCl ali TE pufra (pH 8) po potrebi. Centrifugirno mešanico smo pripravili iz 0,5 µg DNK in 200 µl raztopine CsCl ter mikrocentrifugirko nato dopolnili s 4,8 ml raztopine CsCl. Centrifugirali smo v vertikalnem rotorju VTI 65.2 (Beckman Coulter) 24 h pri 45,000g in 20 °C. Po 24 urnem ultracentrifugiranju smo izvedli frakcionacijo vzorcev iz gradienta CsCl z napravo LKB 8Romma 2112Redirac (Pharmacia LKB, Cambridge, UK). Odvzemali smo 20 frakcij, vsakokrat po 200 µl raztopine, pri čemer so prvotne frakcije predstavljale gosto območje in zadnje najmanj gosto področje v gradientu. Pri ultracentrifugiranju se v gradientu CsCl ustvari tudi gradient DNK, ki vsebuje bodisi težko obliko C (¹³C) bodisi lahko obliko C (¹²C). Frakcijam smo z ročnim refraktometrom ATAGO-R-5000 izmerili gostoto in tudi preverili, ali se je med centrifugiranjem sploh ustvaril linearni gradient gostote. Gradient se je v našem primeru linearno ustvaril, razpon gostote, kjer smo pričakovali težko in lahko obliko DNK, je bil med 1,64 in 1,74 g cm⁻³ (oziroma v refrakcijskem indeksu med 1,3937 in 1,4032).

Po frakcionaciji smo izvedli precipitacijo nukleinskih kislin s PEG preko noči. Usedlino smo naslednji dan sprali dva krat z ledeno hladnim 70% etanolom in po sušenju resuspendirali v 30 µl sterilne destilirane vode.

DNK iz posameznih frakcij smo uporabili kot matrico za pomnoževanje krenarhejskih in bakterijskih genov *amoA* (kot že opisano v poglavju 3.2.7), ki smo jih nato ločili in preverili z metodo DGGE.

3.2.11 Kloniranje in analiza sekvenc genov za 16S rRNK in *amoA*

DNK za knjižnico arhejskih genov za 16S rRNK smo izolirali iz svežih tal (glej poglavje 3.2.5), DNK za knjižnico krenarhejskih genov *amoA* pa smo izolirali iz mikrokozemskega eksperimenta za molekularne študije (glej poglavje 3.2.2.2). Genske produkte pomnožene s PCR, smo klonirali v plazmid pGEM-T Easy vector (Promega, Southampton, UK), po navodilih proizvajalca. Pripravili smo tri knjižnice arhejskih genov za 16S rRNK (označenih z A, B in C predznakom, katerim pa sledi oštevilčenje) iz treh ločenih vzorcev tal in dve knjižnici krenarhejskih genov *amoA* (označeni z 0 in 20 predznakom, katerim sledi oštevilčenje); eno iz tal mikrokozmov ob začetku inkubacije in eno iz tal mikrokozmov po 20 dnevni inkubaciji.

Za kloniranje arhejskih genov za 16S rRNK smo uporabili začetne oligonukleotide Ar109f in Ar915r (Preglednica 4) (Egert in sod., 2004). Za pomnožitev krenarhejskih genov *amoA* pa začetne oligonukleotide crenamoA23f in crenamoA616r (Preglednica 4) (Tournu in sod., 2008).

Izbrane klone smo sekvencirali z uporabo vektorskih začetnih oligonukleotidov T7 in sekvence analizirali z računalniškimi orodji Sequencher 4.1 (Gene Codes Corps, MI, USA), MEGA, BioEdit in spletnega orodja myRDP.

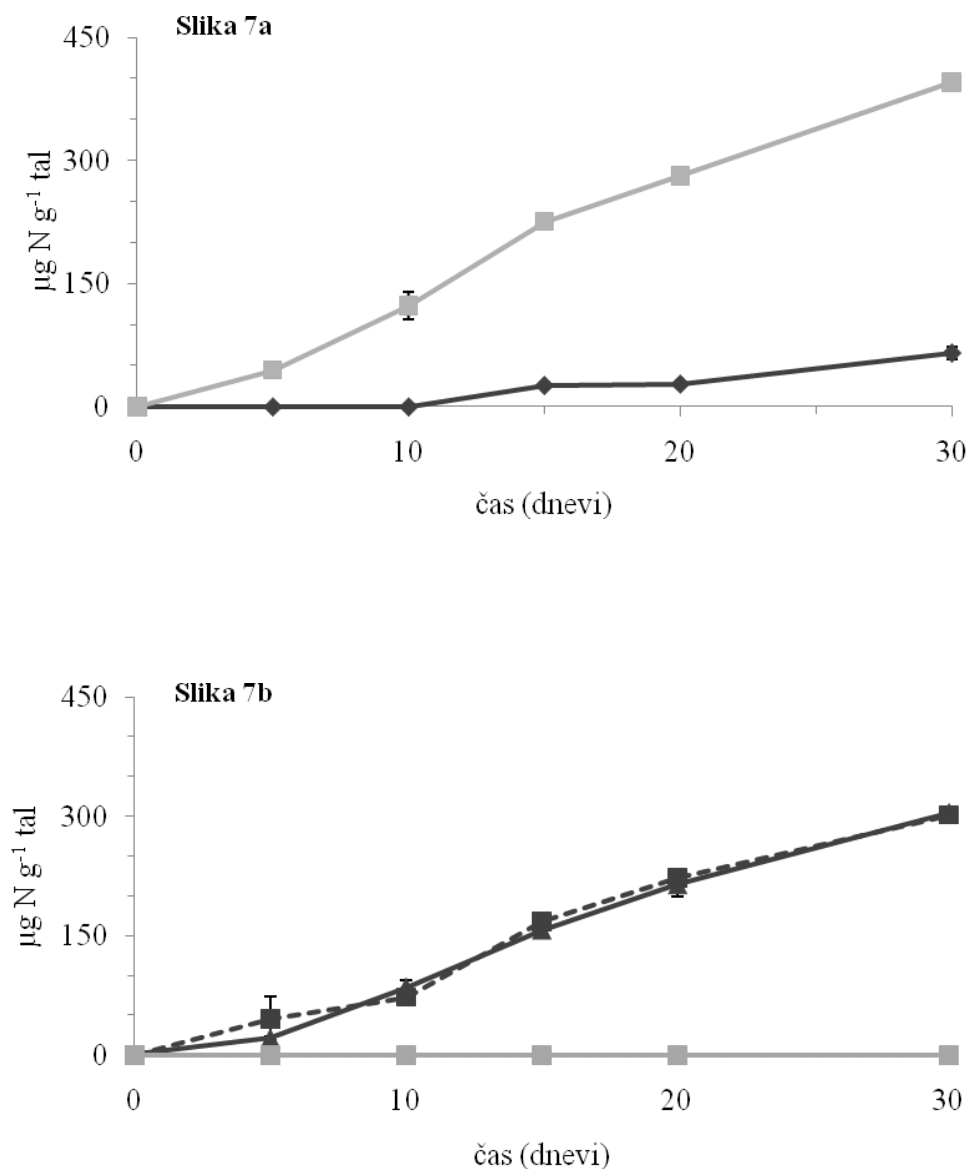
3.2.12 Statistična analiza podatkov

Rezultate nitrifikacijske kinetike in RT-PCR rezultate smo analizirali s pomočjo modela analize varianc (ang. general linear model of ANOVA) s softwareskim programom MINITAB 15 (Minitab, PA).

4 REZULTATI

4.1 NITRIFIKACIJSKA KINETIKA IN ACETILENSKI POSKUS

V okviru diplomskega dela smo želeli ugotoviti ali je povišanje koncentracije ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N po več dnevni inkubaciji kislih tal Ljubljanskega barja, ki smo jo zaznali v preliminarjem poskusu z mikrokozmi (podatki niso prikazani), posledica nitrifikacije s strani avtotrofnih mikroorganizmov. Kisla barjanska tla smo inkubirali v prisotnosti oziroma odsotnosti acetilena, ki je znan inhibitor nitrifikacije. V kontrolnih mikrokozmih brez acetilena je po 30 dnevih inkubacije prišlo do visoke akumulacije nitratnega in nitritnega dušika (Slika 7a), ki je znašala $395 \mu\text{g} (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1} \text{tal}^{-1}$, kar po preračunu, če predpostavimo, da je hitrost nitrifikacije enakomerna, znaša $13,2 \mu\text{g} (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1} \text{tal}^{-1} \text{dan}^{-1}$. V mikrokozmih izpostavljenih acetilenu se nitrat ni akumuliral, višala pa se je koncentracija amonija, ki je po tridesetih dneh dosegla $302 \pm 2 \mu\text{g} (\text{NH}_4^+\text{-N}) \text{g}^{-1} \text{tal}^{-1}$, medtem ko je bila koncentracija amonija v kontrolnih mikrokozmih veliko nižja, $65 \pm 7 \mu\text{g} (\text{NH}_4^+\text{-N}) \text{g}^{-1} \text{tal}^{-1}$. Obe uporabljeni koncentraciji acetilena (10 in 100 Pa) sta bili zadostni za inhibicijo nitrifikacije, s čimer smo potrdili, da je akumulacija nitrata v mikrokozmih resnično posledica nitrifikacije (Slika 7b).



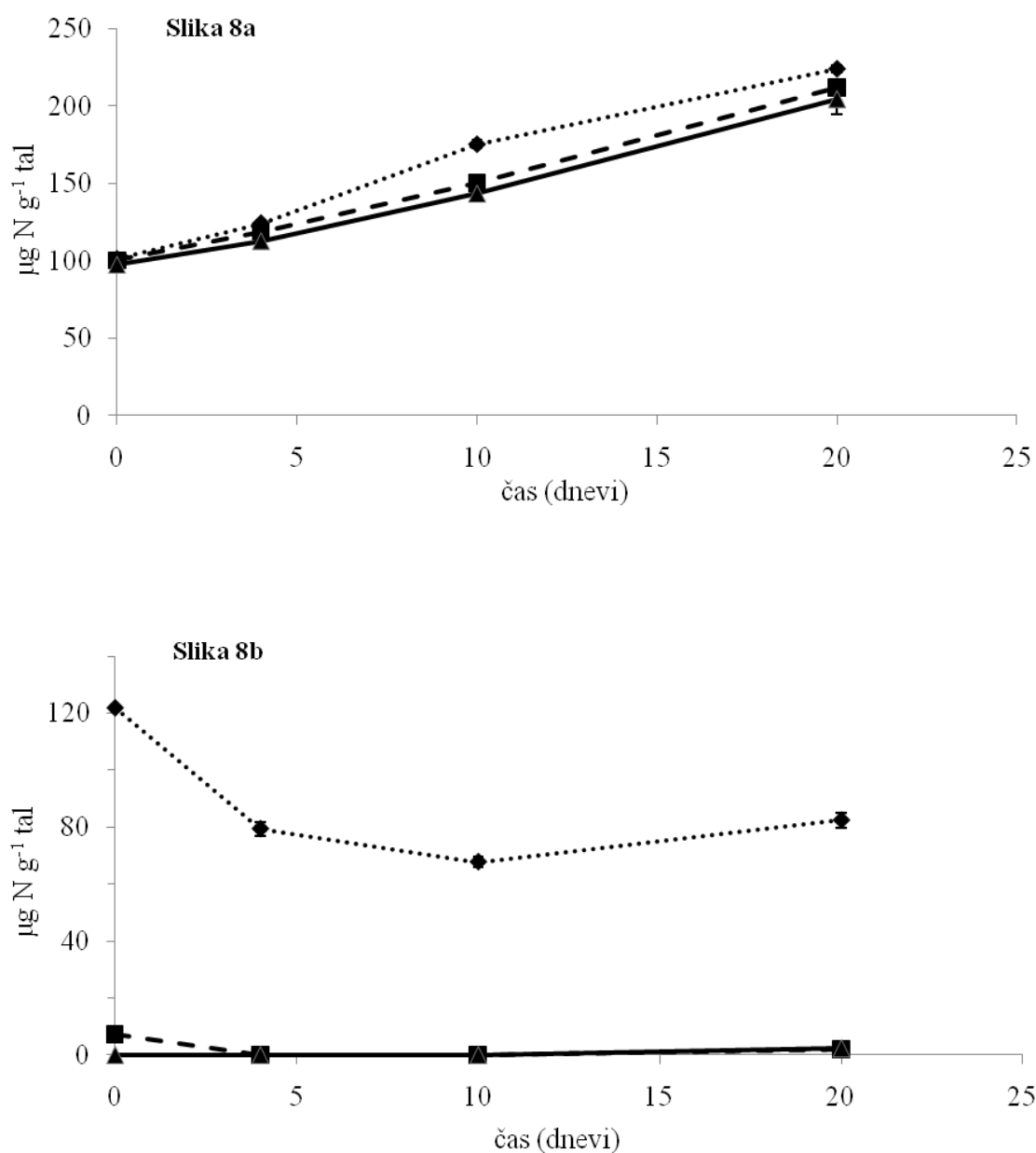
Slika 7: Acetilenski poskus. (7a) Kinetika nitrifikacije v kontrolnih mikrokozmih, kjer ni dodanega C₂H₂. (7b) Kinetika nitrifikacije v mikrokozmih z dodanim C₂H₂.

Sive črte nakazujejo koncentracije (NO₂⁻ + NO₃⁻)-N, temne črte pa nakazujejo koncentracije NH₄⁺-N. Črtkane črte nakazujejo mikrokozme bremenjene z 10 Pa, polne črte pa mikrokozme bremenjene z 100 Pa C₂H₂. Odkloni predstavljajo standardno napako.

4.2 MOLEKULARNE ŠTUDIJE

4.2.1 Nitrifikacijska kinetika

Aktivnosti nitrifikatorjev v talnih mikrokozmihi smo sledili tako, da smo ob različnih časih v teku 20 dnevne inkubacije pri 22 °C določali koncentracijo amonijskega dušika ter nitratnega in nitritnega dušika v inkubiranih tleh. Rezultati so pokazali, da je bila koncentracija ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N na začetku poskusa (dan 0), $99,5 \pm 1,1 \mu\text{g N g}^{-1}$ tal in je nato enakomerno naraščala do maksimalne vrednosti $213 \pm 6 \mu\text{g N g}^{-1}$ tal (Slika 8a). Pri mikrokozmihi bremenjenih z 10 ppm amonijskega dušika je ta padel pod detekcijsko mejo v štirih dneh. Medtem, ko je bremenitev s 100 ppm ($100 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}$ tal) amonijskega dušika pokazala nekoliko drugačen odziv porabe amonija. In sicer je bil po štirih dneh inkubacije opazen upad koncentracije dodanega amonija na vrednost $79 \pm 3 \mu\text{g N g}^{-1}$ tal, nato pa je koncentracija amonija ostaja bolj ali manj enaka do konca inkubacije (Slika 8b). Kljub temu pa je treba poudariti, da je hitrost nitrifikacije izračunana preko akumulacije nitratnega in nitritnega dušika bila visoka (Slika 8a.) in primerljiva s prejšnjim poskusom (glej poglavje 4.1), kar je potrdilo, da nitrifikacija poteka v mikrokozmihi, ki smo jih nato uporabili za molekularne študije.



Slika 8: Nitrifikacijska kinetika v mikrokozmih za molekularne študije. (8a) Koncentracije ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N v mikrokozmih za molekularne študije, (8b) koncentracije NH_4^+ -N v mikrokozmih za molekularne študije.

Pikčasta črta označuje mikrokozme z dodanim $100 \mu\text{g NH}_4\text{-N g}^{-1}$ tal, črtasta z $10 \mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}$ tal in polna brez dodatka $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Odkloni prikazujejo standardno napako.

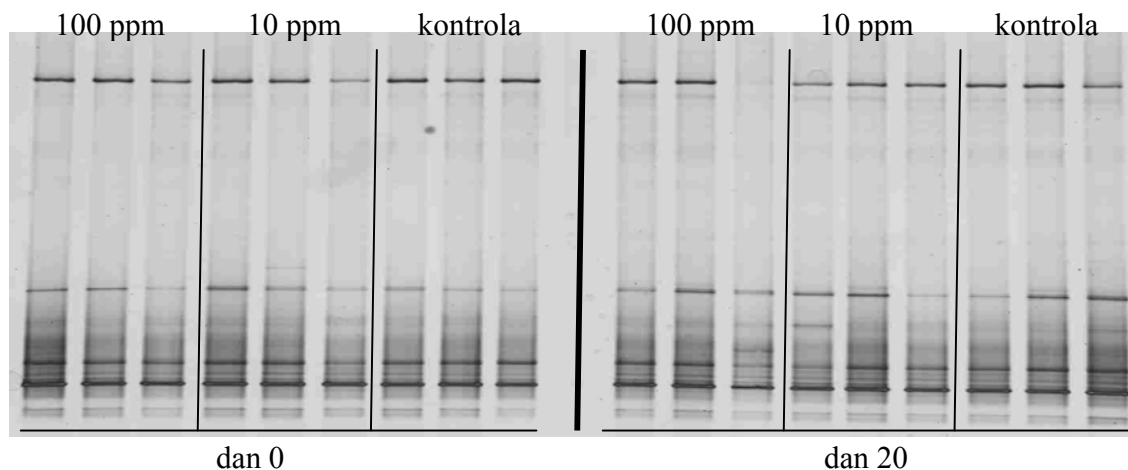
4.2.2 Ugotavljanje vpliva inkubacije in bremenitve z amonijem na strukturo združbe AOB in AOA v talnih mikrokozmih z metodo DGGE

Strukturo združbe amonij oksidirajočih bakterij (AOB) in amonij oksidirajočih arhej (AOA) smo preučevali z metodo DGGE. Matrično DNK izolirano ob različnih časih inkubacije iz tal mikrokozmov (opisano v poglavju 3.2.5) smo uporabili za pridobitev specifičnih pomnožkov genov za bakterijski in arhejski gen 16S rRNK nitrifikatorjev in za *amoA* gen AOB in AOA. PCR smo izvedli z ustreznimi pari začetnih oligonukleotidov (Preglednica 4).

Pri pomnoževanju genov AOB, tako gena za 16S rRNK kot gena *amoA*, nismo bili uspešni, kljub menjavanju pogojev reakcije PCR in parov začetnih oligonukleotidov. Zato pregleda združbe AOB z molekularnimi metodami nismo mogli izvesti.

Za razliko od AOB, je bilo pomnoževanje genov AOA za 16S rRNK in *amoA* uspešno in analizo z DGGE smo izvedli v vseh časovnih točkah vzorčenja (na dan 0, 4, 10 in 20).

Rezultati analize strukture genov so pokazali (Slika 9), da tako inkubacija kot bremenitev z amonijem ne vplivata na strukturo združbe AOA oziroma sestavo opazovanih genov, kar nakazuje na počasno rast AOA v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja.

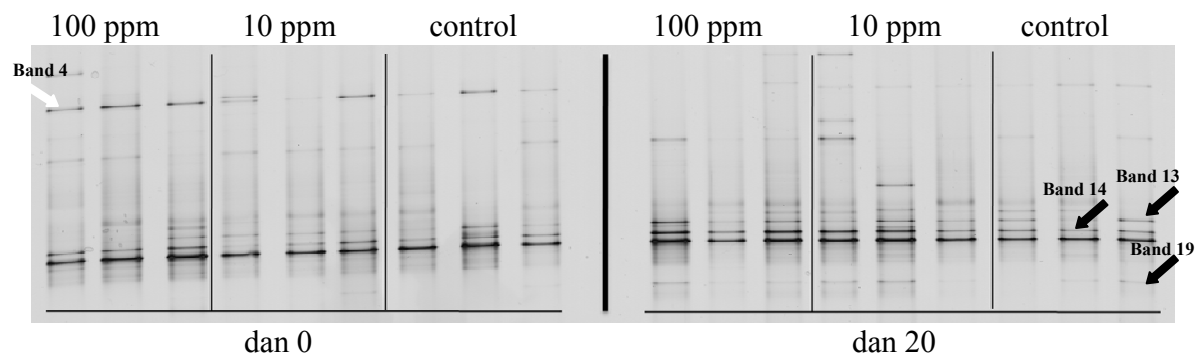


Slika 9: Splošni profil združbe AOA na podlagi *amoA* gena. Predstavljeni sta le dve časovni točki vzorčenja, dan 0 in dan 20.

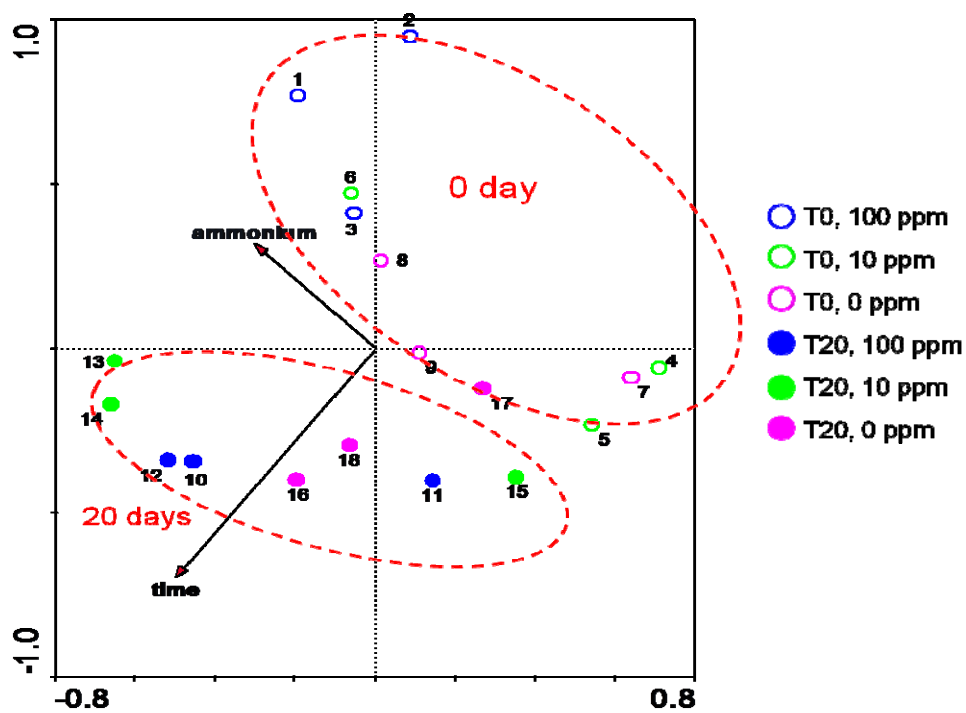
4.2.3 Ugotavljanje vpliva inkubacije in bremenitve z amonijem na strukturo aktivne združbe AOA v talnih mikrokozmi

Poleg sestave združbe na ravni DNK smo preverili tudi sestavo aktivne združbe AOA v mikrokozmi inkubiranih 20 dni. V ta namen smo najprej izvedli reverzen prepis RNK molekul za 16S rRNK in *amoA* iz celokupne izolirane mikrokozemske RNK ob različnih časih vzorčenja.

Analiza aktivne združbe AOA na podlagi *amoA* genskega transkripta je pokazala razlike znotraj združbe (Slika 10), ki so bile posledica inkubacije. Razlike so bile opazne le po 20 dneh inkubacije in ne po 4 ali 10 dneh inkubacije. Poleg tega nismo zaznali vpliva bremenitve z amonijem na strukturo aktivne združbe AOA. Z metodo glavnih komponent (ang. principal component analysis (PCA)) na podlagi relativnih frekvenc lis na gelu DGEE (Slika 11) smo potrdili vpliv časa inkubacije na strukturo združbe AOA ($p < 0,005$). Lise (ang. bands), ki največ prispevajo k temu rezultatu, so oštevilčene in označene s puščicami. Lisa 4 predstavlja tisto skupino AOA, katere aktivnost se s časom inkubacija zmanjšuje, lise 13, 14 in 19 pa tiste skupine, katerim se aktivnost s časom poveča. Metoda PCA je tudi pokazala, da bremenitve tal z $\text{NH}_4^+\text{-N}$, nima vpliva na strukturo aktivne združbe AOA v poskusnih mikrokozmi pod danimi pogoji.



Slika 10: Profil aktivne združbe AOA na podlagi amoA genskega transkripta.



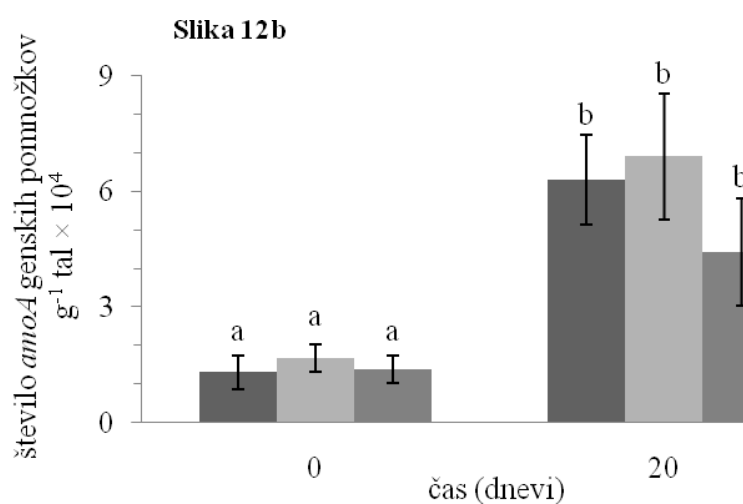
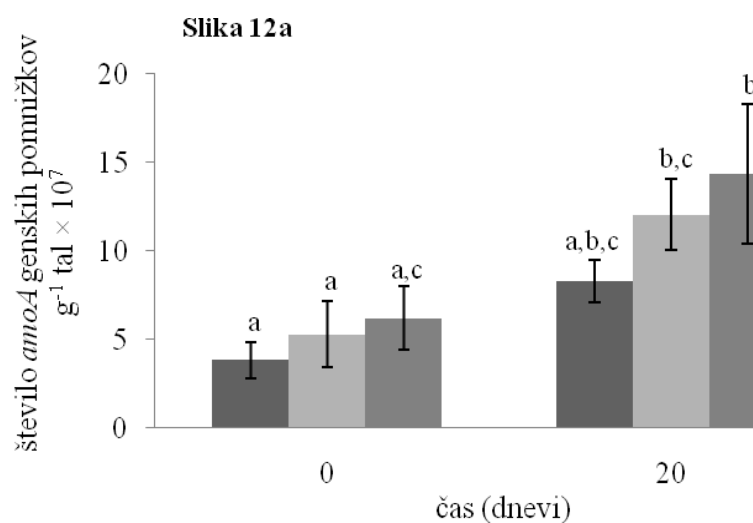
Slika 11: PCA narejena s programom CANOCO (ter Braak in Šmilauer, 2002)

4.2.4 Številčnost in aktivnost nitrifikatorjev v mikrokozemskem poskusu

Za kvantificiranje krenarhejskega gena *amoA* smo uporabili protokol, ki ga je opisal Nicol in sodelavci, 2008. Pomnožek dolg 624bp smo pomnožili z 97% učinkovitostjo (r^2 vrednost 0,992). Številčnost krenarhejskega gena *amoA* se je signifikantno povečala s časom inkubacije ($p < 0,005$), nismo pa dokazali spremembe v številčnosti gena glede na različne bremenitve mikrokozmov z amonijem ($p > 0,005$). Število genov *amoA* se je v vseh treh bremenitvah po 20 dnevih več kot podvojilo. Od začetnega števila $5,1 \pm 1,7 \times 10^7$ do končnega števila $11,6 \pm 1,8 \times 10^7$ pomnožkov *amoA* g⁻¹ tal po 20 dnevih inkubacije (Slika 12a).

Transkripcijsko aktivnost AOA smo določili s kvantifikacijo transkriptov gena *amoA* (Slika 12b). Enako dolg pomnožek smo pomnožili z 93% učinkovitostjo (r^2 vrednost 0,987), pri čemer smo kot matrico uporabili cDNK. Prav tako se je številčnost pomnožkov *amoA* genskih transkriptov povečala s časom inkubacije ($p < 0,005$), kar pa ne drži za bremenitve ($p > 0,005$). Številčnost transkriptov genov *amoA* se je povečalo z $1,45 \pm 0,11 \times 10^4$ na dan 0, na $\sim 5,86 \pm 0,75 \times 10^4$ transkriptov genov *amoA* g⁻¹ tal na dan 20.

Enake metode smo uporabili za določevanje številčnosti in aktivnosti AOB, vendar nismo uspeli pridobiti specifičnih PCR pomnožkov, kar kaže na to, da je število genov in transkriptov *amoA* AOB v kislih tleh Ljubljanskega barja pod mejo detekcije.

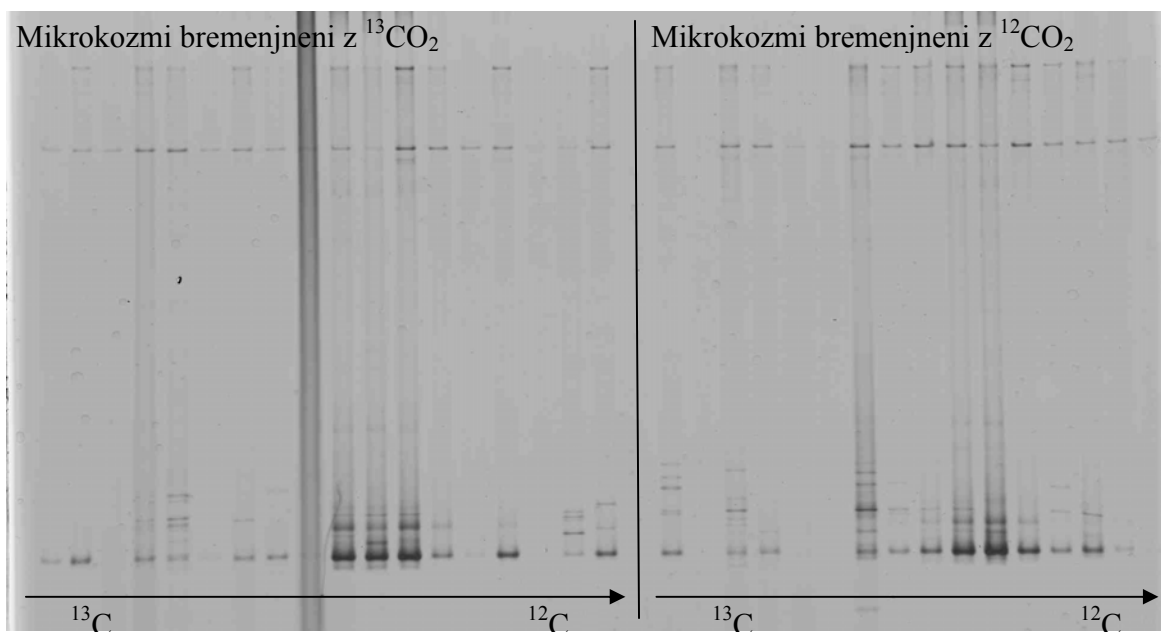


Slika 12: Številčnost in aktivnost nitrifikatorjev v mikrokozemskem poskusu. (12a) Število *amoA* genskih pomnožkov g^{-1} tal po 20 dnevih inkubacije, (12b) število pomnožkov *amoA* transkriptov g^{-1} tal po 20 dnevih inkubacije. Stolpci predstavljajo povprečno vrednost treh ponovitev, odkloni predstavljajo standardno napako.

4.2.5 Stabilno izotopsko sondiranje (SIP)

Za sledenje vstavljanja označenega substrata lahko uporabljamo več različnih metod. Sami smo se odločili za uporabo metode DGGE.

DNK izolirano iz različnih gradientnih frakcij smo uporabili kot matrico za reakcijo PCR v kateri smo specifično pomnožili gen *amoA* AOA (opisano v poglavju 3.2.7). Ob primerjanju profilov tako frakcij iz bremenjenih mikrokozmov, kot frakcij iz nebremenjenih mikrokozmov, nismo mogli ugotoviti inkorporacije ^{13}C v DNK (Slika 12). Iz DGGE profila je razvidno, da je profil v vseh frakcijah gradienta, tako v bremenjenih mikrokozmih kot tudi v nebremenjenih zelo podoben. Če bi do inkorporacije prišlo, bi dobili namreč le specifične lise, z večjo intenziteto v težjih frakcijah bremenjenih mikrokozmov, in slučajno kakšne lise z nižjo intenziteto v nebremenjenih, kar je lahko posledica napak pri frakcionaciji in vsebnosti nizkih koncentracij težkih oblik izotopa v naravi, kar pa je dovolj za sledenje z DGGE metodo.



Slika 13: Pregled inkorporacije ^{13}C v DNK molekulo arhejskih oksidatorjev amonijaka.

4.2.6 Filogenetska analiza

Za natančnejši pregled arhejske združbe v vzorčenih tleh smo izvedli sekvenciranje arhejskih genov za 16S rRNK (dolžina 806 bp) in krenarhejskih genov *amoA* v dolžini 624 bp. Pridobljene sekvence smo analizirali s programskimi orodji za primerjavo sekvenc in za filogenetsko analizo. V obeh primerih smo prekratke (< 600 bp in < 400 bp) in himerne sekvence izključili iz analize. Sekvence smo poravnali s sekvencami referenčnih vrst v programu BioEdit in za izrisanje drevesa uporabili program MEGA4 (Tamura in sod., 2007).

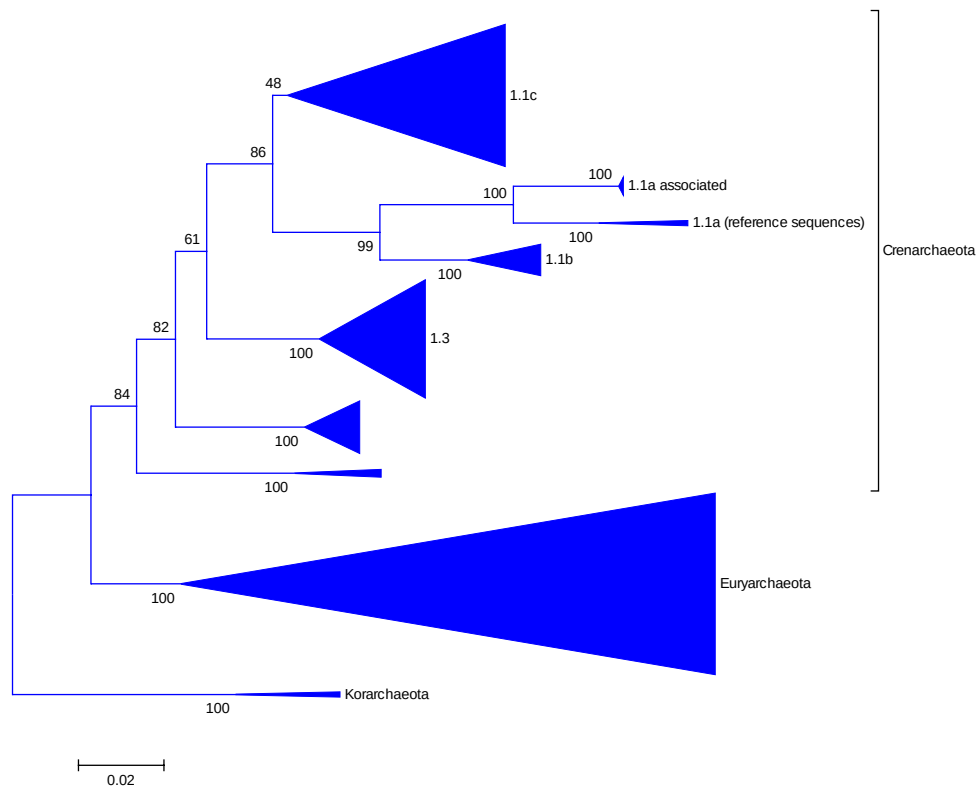
Za izdelavo drevesa s sekvencami gena 16S rRNK smo uporabili metodo Bootstrap s 100 ponovitvami in Neighbor-Joining ter substitucijski model Maximum Composite Likelihood.

Za izdelavo drevesa s sekvencami gena *amoA* AOA smo uporabili metodo Bootstrap s 100 ponovitvami in Neighbor-Joining ter substitucijski model JTT matrix-based.

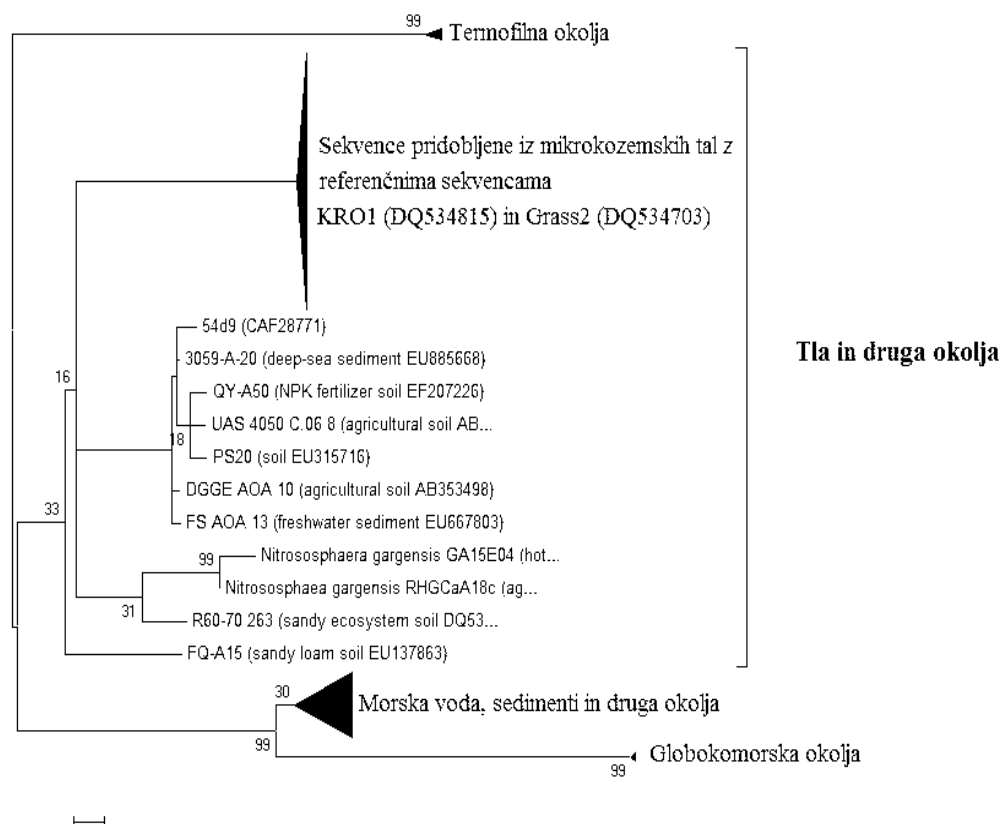
Filogenetska analiza, ki smo jo naredili na arhejskih genih 16S rRNK (Slika 14), je prva tovrstna analiza narejena na šotnih kisljih tleh Ljubljanskega barja, ki nam da vpogled na arhejsko združbo v tem okolju. Od 192 klonov, ki smo jih pripravili za arhejsko 16S rRNK klonsko knjižnico, smo uspeli določiti sekvenco pri 167. 108 od teh je pripadalo deblu Crenarhaeota in 59 deblu Euryarchaeota, v katerem prevladujejo metanogene arheje.

Znotraj debela Crenarhaeota, prevladujeta dve skupini in sicer krenarheje iz skupin 1.1c in 1.3. Večina krenarhejskih sekvenc se je uvrstila v skupine, pri katerih nitrifikacija še ni bila potrjena ($\approx 91\%$), in le majhen delež (9%) se je uvrstil v skupino, katere lahko povežemo z nitrifikacijo, in sicer 1.1b.

S filogenetsko analizo, ki smo jo naredili na krenarhejskih genskih sekvencah *amoA* (Slika 15), smo želeli ugotoviti, katere AOA so prisotne v tleh mikrokozmov, ki smo jih pripravili za molekularne študije. Od 98 klonov, ki smo jih pripravili za AOA *amoA* klonsko knjižnico, smo uspeli določiti sekvenco pri 89. Vse sekvence, ki smo jih pridobili so se uvrstile v skupino, ki so jo Nicol in sodelavci (2008) poimenovali, Tla in sedimenti, podskupino z referenčnima sekvencama KRO1 in Grass2.



Slika 14: Filogenetska analiza arhejskih 16S rRNK genskih sekvenc pridobljenih iz kislih šotnih tal Ljubljanskega barja. Višina in dolžina posameznih trikotnikov predstavlja število in največjo razdaljo vej znotraj linij. Zaradi lažje preglednosti so skupine pridobljenih sekvenc in referenčnih sekvenc združene. Preglednejše drevo se nahaja v poglavju priloga (Priloga A).



Slika 15: Filogenetska analiza krenarhejskih *amoA* genskih sekvenc pridobljenih iz mikrokozemskih tal. Višina in dolžina posameznih trikotnikov predstavlja število in največjo razdaljo vej znotraj linij. Vse sekvence se nahajajo znotraj ene skupine. Preglednejše drevo se nahaja v poglavju priloga (Priloga B).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo preučili nitrifikacijsko aktivnost ter vpliv bremenitve tal z amonijem na sestavo, transkripcijsko aktivnost in številčnost krenarhej, ki oksidirajo amonij v kisljih šotnih tleh visokega Ljubljanskega barja. Vzorčena tla na področju Kozlarjeve gošče predstavljajo le majhen del površine barja. Podobna tla najdemo še na dveh drugih lokacijah Ljubljanskega barja in ta področja predstavljajo ostanke nekdanjega visokega barja, ki se je zaradi rezanje šote in izsuševanja v zadnjih stoletjih spremenilo. Vendar so ta tla zanimiva za preučevanje nitrifikacije, ker imajo nizek pH (pH 4.3), visoko vsebnost organske snovi, izredno visoko kapaciteto za zadrževanje vode in nizko talno gostoto, kar so lastnosti, ki lahko vplivajo na nitrifikacijo in katerih vpliv v podobnem tipu tal še ni dobro preučen.

Spremljanje nastajanja ali porabljanja določenih snovi je pogosto uporabljena metoda za sledenje mikrobne aktivnosti. Nitrifikacijo v tleh smo sledili tako, da smo merili kopičenje $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}$ in hkrati porabo $\text{NH}_4^+\text{-N}$ v talnih mikrokozmi. Na koncentracijo $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}$ v tleh poleg avtotrofne nitrifikacije vplivajo tudi drugi mikrobni procesi kot so heterotrofna nitrifikacija in mineralizacija, ki višata koncentracijo nitrata ter nitrifikatorska denitrifikacija in heterotrofna denitrifikacija, ki koncentracijo nitrata nižata. Za povezavo avtotrofne nitrifikacije z nastajanjem $(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N}$ smo uporabili acetilen (C_2H_2), ki inhibira amonij monooksigenazo (AMO). C_2H_2 se veže na aktivno mesto amonij monooksigenaze (AMO), in sicer na aminokislinski ostanek His-191, ki je del aktivnega mesta in s tem inhibira delovanje encima AMO (Gilch in sod., 2009).

Koncentracije 10 in 100 Pa acetilena, ki smo jih uporabili v tem diplomskem delu, so zadostovale za inhibicijo nitrifikacije. To se sklada z drugimi študijami, kjer so koncentracije C_2H_2 okoli 10 Pa bile dovolj, da se proces nitrifikacije ustavi (Bateman in Baggs, 2005; Offre in sod., 2009). V kontrolnih mikrokozmi, kjer acetilena nismo dodajali, smo izmerili visoko stopnjo nitrifikacije, ki je dosegla tudi do $13,2 \mu\text{g } (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1} \text{ tal}^{-1} \text{ dan}^{-1}$, kar je bistveno več, kot so to izmerili Tournu in sodelavci (2008), ki so spremljali vpliv temperature na nitrifikacijo s strani arhej in bakterij v kmetijsko obdelanih tleh. In sicer so po 55 dnevni

inkubaciji mikrokozmov pri temperaturi 30 °C izmerili maksimalno koncentracijo ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N 60 $\mu\text{g N g}^{-1}$ tal. Nugroho in sodelavci (2006), ki so študirali nitrifikacijo v kislih tleh borovega gozda, so opredelili nitrifikacijo kot nizko, ko je bilo izmerjenega ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N pod 0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal teden⁻¹ in kot visoko, kjer je izmerjenega ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N bilo več kot 11 $\mu\text{g g}^{-1}$ suhih tal teden⁻¹, kar je v obeh primerih precej nižja nitrifikacijska aktivnost kot smo jo izmerili v kislih tleh Ljubljanskega barja. Na drugi stran pa so v šotnih tleh nizkega Ljubljanskega barja, ki imajo nevtralni pH, bile hitrosti nitrifikacije v nebremenjenih tleh nekoliko višje, do 28 $\mu\text{g} (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1} \text{ tal}^{-1} \text{ dan}^{-1}$, v tleh bremenjenih z amonijem pa so dosegale tudi do ~50 $\mu\text{g} (\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1} \text{ tal}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ (Pal in sod., članek v pripravi).

Podoben trend nitrifikacije smo zaznali v talnih mikrokozmihi, ki smo jih pripravili za molekularne študije sestave, aktivnosti in številčnosti nitrifikatorjev. Mikrokozme smo bremenili z 10 in 100 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}$ tal. Po 20 dnevni inkubaciji so bile koncentracije ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N okoli 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ tal pri obeh bremenitvah in pri kontrolnem setu mikrokozmov. Zaradi transporta tal iz Slovenije v Aberdeen, ki je trajal približno 4 dni, je kljub nizki temperaturi (zimski čas) nitrifikacija v transportiranih tleh verjetno že potekala, kar bi lahko bil razlog za akumulacijo nitratnega dušika, ki smo ga izmerili ob pripravi mikrokozmov (Slika 8a). Začetne koncentracije ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$)-N v tleh, ki smo jih pakirali v mikrokozme, je bila 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ tal, kar v tleh takoj po vzorčenju nismo zaznali. Kljub temu menimo, da to ni vplivalo na proces nitrifikacije med inkubacijo mikrokozmov. Hitrost nitrifikacije je bila sicer počasnejša v primerjavi s prvim poskusom (acetilenski poskus), vendar je razlog temu verjetno temperatura inkubacije, ki je bila pri acetilenskem poskusu 28 °C, pri mikrokozmihi za molekularne študije pa 22 °C. Ker smo tla v teh mikrokozmihi bremenili z različnimi koncentracijami amonija so bile začetne koncentracije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ različne. Opazen je padec koncentracij $\text{NH}_4^+\text{-N}$ s časom inkubacije, kar nakazuje na porabo le tega, vendar pa pri bremenitvi tal s 100 $\mu\text{g NH}_4^+\text{-N g}^{-1}$ tal le ta ne pade na nič. Koncentracija amonija se je namreč po štirih dneh ustalila pri približno 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ tal in nadaljnjega trenda upadanja nismo zasledili (Slika 8b). To bi lahko pripisali lastnosti tal, ki smo jih preučevali, saj so ta tla Ljubljanskega barja bogata z organskim dušikom (2,75%), ki se neprestano mineralizira in je torej že po naravi to okolje nasičeno z NH_3 , ki ga lahko nitrifikatorji porabljajo. Tako je, ne glede na to koliko amonija dodamo, le tega nemogoče v celoti porabiti, saj je presto

dostopnega dovolj. Mogoče bi se kinetika porabe amonija spremenila ob dolgotrajnejši inkubaciji in ob višji temperaturi inkubacije, kar bo potrebno še eksperimentalno preveriti.

Okoljski dejavniki, ki imajo največji vpliv na združbo nitrifikatorjev so pH, dostopnost NH_3 , vsebnost organske snovi in dostopnost kisika (Kowalchuk in Stephen, 2001; de Boer in Kowalchuk, 2001). Nekatere teh dejavnikov smo preizkusili tudi sami na mikrokozmi, ki smo jih pripravili za molekularne študije in sicer smo spremljali vpliv dodanega amonija in vpliv časa inkubacije. Izpostavili pa bi, da so tla kislja in zato nas je dodatno zanimalo, kako se na izpostavljene dejavnike okolja odzivajo v kisljih tleh bakterije in arheje, ki oksidirajo amonijak. Nugroho in sodelavci (2006) so ugotovili, da ima pH izreden vpliv na nitrifikacijo, ki jo izvajajo bakterije. Vpliv pH se kaže predvsem v znižanju nitrifikacijske sposobnosti in ne vpliva na zastopanost bakterij v takšnem okolju. Ugotovili so korelacijo med razmerjem C:N in prisotnostjo AOB. Ob visokem razmerju C:N, okoli 26, AOB niso mogli zaznati. To je v skladu z našimi rezultati, saj tudi v barjanskih tleh nismo uspeli pomnožiti *amoA* genov AOB in 16S rRNK AOB, kar kaže na to da so verjetno te bakterije prisotne v zelo nizkem številu. Veliko število arhej v tem okolju pa je privedlo do uspešnega pomnoževanja genov 16S rRNK in *amoA* AOA. To je v skladu z visoko zastopanostjo krenarhej v različnih okoljih, tako v morskih (Francis in sod., 2007) kot v vročih termalnih vrelih (Hatzenpichler in sod., 2008) in talnih/kopenskih ekosistemih (Nicol in sod., 2003; Leininger in sod., 2007; Tournu in sod., 2008).

Zaradi kratkega časa inkubacije (20 dni) nismo uspeli zaznati vpliva inkubacije in bremenitve z amonijem na strukturo združbe AOA v talnih mikrokozmi. To je v skladu s pričakovanji saj je rast AOA zelo počasna (Könneke in sod., 2005) in je v tako kratkem času inkubacije z metodo DGGE težko zaznati manjše premike na nivoju sestave združbe. Vendar pa smo z našim pristopom dobili prvi vpogled v združbo AOA v barjanskih šotnih tleh (Slika 9). Iz profila je razvidnih 19 ločenih lis, ki predstavljajo najbolj zastopani del združbe AOA. Vsaka od 19 lis ni nujno, da predstavlja različno vrsto, saj je metoda DGGE zelo občutljiva in lahko razloči razlike že v samo enem nukleotidu. Vir napak je vsekakor lahko tudi predhodno pomnoževanje genov s PCR. Kot je znano, polimeraze že po naravi niso 100% natančni encimi in zato smo tudi pri različnih analizah podatkov, kjer smo predhodno uporabljali

polimeraze, upoštevamo 1% napako zaradi napake encima, pri rezultatih metode DGGE pa se moramo zavedati, da so te napake vir dodatnih lis v profilih združb.

Na drugi strani je bila 20 dnevna inkubacija zadostna, da smo zaznali razlike v aktivnosti združbe AOA (Slika 10). Rezultati so pokazali, da bremenitev z $\text{NH}_4^+\text{-N}$ nima vpliva na strukturo aktivne združbe, ki smo ji sledili preko transkriptov *amoA*. S časom inkubacije pa vidimo, da se vzorec lis spremeni in tako analiza PCA pokaže, da je čas inkubacije tista spremenljivka, ki vpliva na strukturo aktivne združbe AOA, kar pomeni, da so pri danih pogojih, kjer nitrifikacije teče, določeni sevi AOA združbe bili bolj aktivni kot drugi in da so verjetno AOA potencialni kandidati, ki vršijo nitrifikacijo v kisljih tleh Ljubljanskega barja in so zanimivi za nadaljnje preučevanje. V profilu vidimo izrazito spreminjanje štirih lis (označeni in oštevilčeni v Slika 10), vendar pa tudi ostale lise sledijo temu trendu in se lepo združujejo v dve skupini glede na čas inkubacije (Slika 11).

Številčnost nitrifikatorjev, tudi tistih aktivnih v mikrokozemskem poskusu, smo določali z metodo RT-PCR. V preiskovanih tleh smo z metodo RT-PCR zaznali do približno 1×10^8 kopij gena *amoA* g^{-1} suhih tal po 20 dnevih inkubacije (Slika 12a), kar se sklada z rezultati, ki so jih dobile druge raziskovalne skupine. Aktivno družbo smo kvantificirali na podlagi števila *amoA* genskih transkriptov (Slika 12b). Pri tem smo dobili še izrazitejši vpliv časa inkubacije na aktivno združbo, vendar pa je bilo število kopij transkriptov gena *amoA* (približno 6×10^4 kopij g^{-1} tal) manjše od kopij gena *amoA* in to za približno 10^3 . Leiniger in sodelavci (2006) so ugotovili, da so AOA v vseh preiskovanih talnih vzorcih številčnejše od AOB. Slednje so bile v določenih tleh tudi do 3000 krat manj številčne od AOA. Število kopij genov *amoA* je bilo med 7×10^6 in 1×10^8 g^{-1} suhih tal. Podobno število kopij so izmerili tudi Nicol in sodelavci (2008) v organskih tleh (Craibstone), ki so se razlikovala v pH. Najvišje število kopij *amoA* AOA so zaznali pri najnižjem pH (4,9) in sicer okoli 1×10^7 g^{-1} tal. V obeh študijah pa so naleteli na nižjo ekspresijo genov *amoA* kot je bilo genov *amoA* predstavnikov AOA. Podobno smo opazili tudi v naši študiji. Nicol in sodelavci (2008) so ta pojav razložili z domnevo, da prihaja pri hranjenju mRNK do izgub ali/in se le del mRNK prepiše v komplementarno obliko DNA pri reverzni transkripciji. Kakorkoli, podatki nakazujejo na to, da je le del združbe AOA aktiven, medtem ko je bila aktivnost združbe AOB pod mejo detekcije. Naši

rezultati so v skladu z rezultati študije Nicol in sodelavci (2008), obstajajo pa tudi študije, ki kažejo obratno sliko, kjer so izmerili večjo aktivnost AOB kot AOA. Takšno študijo sta opravila Jia in Conrad (2009) v kateri sta opazovala številčnost in pa predvsem aktivnost obeh predstavnikov nitrifikatorjev v kmetijsko obdelanih tleh z nevtralnimi pH ter nižjo vsebnostjo ogljika in dušika, kot pa v Craibston tleh, ki so jih raziskovali Nicol in sodelavci (2008) in kot jo najdemo v kisljih tleh Ljubljanskega barja.

S stabilnim izotopskim sondiranjem smo želeli dodatno potrditi avtotrofno rast združbe AOA v kisljih tleh Ljubljanskega barja. Kljub konstrukciji pravilnega CsCl gradienta z ultracentrifugiranjem, nismo uspeli pridobiti frakcij DNK, ki bi nakazovala inkorporacijo ^{13}C . Razlog temu bi lahko iskali v premajhni koncentraciji uporabljenega $^{13}\text{CO}_2$ (5%) in počasni rasti AOA, tako da na osnovi naših izkušenj lahko predlagamo, da se v prihodnosti za podobne eksperimente poviša koncentracija $^{13}\text{CO}_2$, ki ga dodajamo talnim mikrokozmom.

Deblo Crenarchaeota vsebuje hipertermofilne kot netermofilne predstavnike, ki so globalno porazdeljeni in široko zastopani. Deblo sestoji iz kar nekaj linij. Tako imenovana Skupina I, z netermofilnimi predstavniki, je še posebej raznovrstna in številčna skupina, ki jo je med prvimi opredelil DeLong (1998). Na podlagi takrat znanih arhejskih genov 16S rRNK je ustvaril filogenetsko drevo in ugotovil združevanje sekvenc na podlagi okolja, kjer so bile le te najdene. Tako je prišel do pet glavnih podskupin glede na pojavljanje v okolju:

- podskupina 1.1a - morska okolja
- podskupina 1.1b - tla, jezerski sedimenti
- podskupina 1.1c - gozdna tla
- podskupina 1.2 - morski in jezerski sedimenti
- podskupina 1.3 - jezerski sedimenti, anaerobni sistemi

Nadaljevanju tega dela se je lotil predvsem Nicol (Nicol in sod., 2003; Nicol in Schleper, 2006), ki je še dodatno razširil skupine in dodal nove predstavnike. Ker pa na podlagi 16S rRNK genov ne moremo natančno določiti ali gre za predstavnika AOA ali ne, je nadaljnje delo temeljilo na analizi sekvenc *amoA*. Tako so Nicol in sodelavci, 2008 ter Prosser in Nicol,

2008 skonstruirali novo drevo, ki pa ni bistveno različno od tistega narejenega na podlagi genov za 16S rRNK.

Filogenetska analiza, ki smo jo naredili na arhejskih genih za 16S rRNK, je prva tovrstna analiza narejena na šotnih kisljih tleh Ljubljanskega barja, ki nam da vpogled na arhejsko združbo v tem okolju. Od analiziranih sekvenc genov za arhejske 16S rRNK smo jih 108 uvrstili v deblo Crenarhaeota in 59 v deblo Euryarchaeota, v katerem prevladujejo metanogene arheje.

Znotraj debela Crenarhaeota sta prevladovali dve skupini in sicer krenarheje iz skupin 1.1c in 1.3. Večina krenarhejskih sekvenc se je uvrstila v skupine, pri katerih nitrifikacija še ni bila potrjena ($\approx 91\%$), in le majhen delež (9%) se je uvrstil v skupino, katere lahko povežemo z nitrifikacijo, in sicer 1.1b. Do danes velja, da sta za nitrifikacijo odgovorni skupini 1.1a in 1.1b. Skupina 1.1a je veljala še do nedavnega za skupino povezano le z morskimi ekosistemi, vendar pa so analize potrdile obstoj teh tudi v kopenskih ekosistemih (Kemnitz in sod., 2007; Tourna in sod., 2008). Skupina 1.1b pa je skupina, ki je največkrat zastopana v talnih ekosistemih.

Ker analize krenarhejskih 16S rRNK genskih sekvenc pridobljenih iz kisljih tal barij še ni bila narejena je primerjava s knjižnicami narejenih s sekvencami pridobljenih iz drugih okolij neprimerna. Za primerjanje je najprimernejša študija Kemnitz in sodelavci (2007), ki so se lotili analize arhejskih sekvenc iz kisljih gozdnih tal. Večina sekvenc je v teh tleh pripadala skupinama 1.1c in 1.1b. Da je skupina 1.1c povezana le z nizkim pH, so prav tako ugotovili Nicol in sodelavci (2008) v študiji, kjer so ugotavljali vpliv pH na nitrifikatorje v tleh. Skupina 1.1b pa je vsebovala sekvence pridobljene tako iz tal z nizkim kot iz tal z visokim pH.

S filogenetsko analizo krenarhejskih genskih sekvenc *amoA* smo ugotovili, da se le te uvrščajo v skupino, ki so jo Nicol in sodelavci (2008) poimenovali »Tla in sedimenti« podskupino z referenčnima sekvencama KRO1 in Grass2. V to skupino so se že v študij Nicol in sodelavci (2008) večinoma uvrstile sekvence, ki so bile pridobljene iz kisljih tal (pH 4,9). S primerjavo 16S rRNK filogenetskega drevesa z *amoA* filogenetskim drevesom so ugotovili, da so to sekvence predstavnikov podskupine 1.1b, ki smo jih našli tudi v knjižnici genov za 16S rRNK.

5.2 SKLEPI

- Nitrifikacija v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja poteka
- Filogenetska analiza 16S rRNK genskih sekvenc iz okolja je pokazala pestro sestavo arhej, kamor se je večina uvrstila v deblo Crenarchaeota, predvsem v skupini 1.1c in 1.3. Vse *amoA* genske sekvence pridobljene iz mikrokozemskih tal, so se uvrstile v skupino 1.1b oziroma skupino, ki je največkrat povezana s tlemi
- AOB z metodo PCR nismo zaznali, kar nakazuje na njihovo maloštevilčnost v tem kislem in občasno anaerobnem okolju
- Rezultati nakazujejo, da so krenarheje primarno odgovorne za oksidacijo amonijaka v kislih šotnih tleh Ljubljanskega barja, saj so v preučevanih tleh številčnejše in kažejo transkripcijsko aktivnost *amoA* gena in rast v poučevanih tleh
- Bremenitev z amonijem ne vpliva na hitrost nitrifikacije in na strukturo in številčnost AOA

6 POVZETEK

Tla Ljubljanskega barja s svojimi specifičnimi lastnostmi predvsem pa nizkim pH so zanimiva za študij vpliva okoljskih dejavnikov na nitrifikacijsko združbo. V mikrokozemskem eksperimentu, v katerem smo tla bremenili z 10 in 100 $\mu\text{g N g}^{-1}$ tal in inkubirali 20 dni pri 22 °C, smo preučili vpliv bremenitve z amonijskim dušikom na sestavo, številčnost in aktivnost nitrifikatorske združbe bakterij in arhej v kislih tleh.

Nitrifikacija je bila v kislih šotnih tleh aktivna in hitrost nitrifikacije je bila med 10 in 13 $\mu\text{g (NO}_2^- + \text{NO}_3^-)\text{-N g}^{-1}\text{ tal}^{-1}\text{ dan}^{-1}$, kar je ob primerjanju izsledkov drugih študij precej višje (Nugroho in sod., 2006; Tourna in sod., 2008).

Prisotnosti bakterij, ki oksidirajo amonijak (AOB) v teh tleh nismo uspeli dokazati, kljub uporabi različnih metod in pogojev pomnoževanja genov za 16S rRNK in *amoA*. To dejstvo pripisujemo lastnostim tal in okolju v katerem so bila tla odvzeta. Kisel pH, visoko razmerje C:N in predvsem občasna anaerobnost okolja verjetno negativno vplivajo na število AOB, kot so to dokazali že v drugih študijah (Nugroho in sod., 2006).

Prvi vpogled v združbo arhej, ki oksidirajo amonijak (AOA) nam je omogočila metoda DGGE s katero smo ločevali pomnožke genov *amoA* in 16S rRNK (rezultati niso prikazani). Kot je bilo pričakovano, zaradi kratkega časa inkubacije in počasne rasti arhej, nismo uspeli zaznati vpliva bremenitve z amonijskim dušikom na združbo. Opazen vpliv pa se je pokazal ob pregledu aktivne združbe AOA z metodo DGGE, v okviru katere smo sledili genskim transkriptom genov. Tako smo opazili zanimive spremembe, ki so nakazovale vpliv časa inkubacije in ne bremenitve okolja, a le na podlagi *amoA* genskih transkriptov. Opaženih je bilo 19 lis, od katerih so vsaj 4 lise kazale spremembe v intenziteti v odvisnosti od časa inkubacije.

Vpliv časa inkubacije so še dodatno podkrepili rezultati številčnosti in aktivnosti združbe AOA. po 20 dneh inkubacije je število kopij *amoA* genov in njihovih transkriptov naraslo na 1

$\times 10^8$ kopij *amoA* g⁻¹ suhih tal oziroma na 6×10^4 kopij transkriptov *amoA* g⁻¹ suhih tal, kar je bilo signifikantno več ($p < 0,005$) kot ob začetku inkubacije.

S stabilnim izotopskim sondiranjem (SIP) smo želeli dodatno preučiti avtotrofno nitrifikacijo, ki bi jo spremljali z inkorporacijo ¹³C v genomsko DNK AOA, kar nam v omejenem času diplomskega eksperimentalnega dela ni uspelo. Vendar rezultati kažejo, da bi višje koncentracije označenega substrata, ki ga dodajamo v talne mikrokozme, lahko pripomoglo k optimizaciji izvedbe SIP na kisljih šotnih tleh Ljubljanskega barja.

Filogenetska analiza arhejskih sekvenc 16S rRNK iz vzorčenih tal je pokazala pestro sestavo arhejskih nitrifikatorjev, ki se uvrščajo v deblo Crenarchaeota. Čeprav je nitrifikacijska stopnja in številčnost AOA v mikrokozemskih vzorcih visoka, se je po filogenetski analizi le dobrih 9% vseh krenarhejskih sekvenc uvrstilo v skupine, za katere vemo, da vsebujejo *amoA* gen in so tako sposobne oksidacije amonijaka. Presenetljivo veliko sekvenc se je uvrstilo v skupino krenarhej 1.3, našli pa smo tudi precej sekvenc iz skupine 1.1c, ki so značilne za kislja tla. Obe skupini so zelo slabo raziskani.

S filogenetsko analizo genskih sekvenc *amoA*, ki smo jih pridobili iz mikrokozemskih tal, smo želeli ugotoviti katere AOA so v teh tleh prisotne pod danimi pogoji in s primerjavo z drugimi študijami ugotoviti v katere skupine in podskupine jih lahko razvrstimo. Rezultati te analize so pokazali, da so vse sekvence pridobljene iz tal mikrokozmov uvrščajo znotraj krenarhej skupine 1.1b in sicer v podskupino, za katero so že Nicol in sodelavci (2008) ugotovili, da je povezana z okolji z nizkim pH.

Rezultati te diplomske naloge nakazujejo, da so krenarheje primarno odgovorne za avtotrofno oksidacijo amonijaka v kisljih šotnih tleh Ljubljanskega barja.

7 VIRI

- Arp D. J., Sayavedra-Soto L. A., Hommes N. G. 2002. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea*. Archives of Microbiology, 178: 250-255.
- Ausec L., Kraigher B., Mandič-Mulec I. 2009. Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soils. Soil Biology & Biochemistry, 41: 1874-1881.
- Bateman E. J., Baggs E. M. 2005. Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. Biology and Fertility of Soils, 41: 379-388.
- Broda E. 1977. Two kinds of lithotrophs missing in nature. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 17: 491-493.
- Burton S. A., Prosser J. I. 2001. Autotrophic ammonia oxidation at low pH through urea hydrolysis. Applied and Environmental Microbiology, 67: 2952-2957.
- DeLong E. 1998. Archaeal means and extremes. Science, 280: 542-543.
- Dumont M. G., Murrell J. C. 2005. Stable isotope probing - Linking microbial identity to function. Nature Reviews Microbiology, 3: 499-504.
- Francis C. A., Roberts K. J., Beman J. M., Santoro A. E., Oakley B. B. 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 14683-14688.
- Francis C.A., Beman J.M., Kuypers M.M.M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. ISME Journal, 1: 19-27.

- Freitag T. E., Chang L., Prosser J. I. 2006. Changes in the community structure and activity of betaproteobacterial ammonia-oxidizing sediment bacteria along a freshwater-marine gradient. *Environmental Microbiology*, 8: 684-696.
- Griffiths R. I., Whiteley A. S., O'Donnell A. G., Bailey M. J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5488-5491.
- Gilch S., Vogel M., Lorez M. W., Meyer O. Schmidt I. 2009. Interaction of the mechanism-based inactivator acetylene with ammonia monooxygenase of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology*, 155: 279-284.
- Großkopf R., Janssen P. H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 960-969.
- Jin Z., Conrad R. 2009. *Bacteria* rather than *Archaea* dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11: 1658-1671.
- Jetten M. S. M., Strous M., Van De Pas-Schoonen K. T., Schalk J., Van Dongen U. G. J. M., Van De Graaf A. A., Logemann S., Muyzer G., Van Loosdrecht M. C. M., Kuenen J. G. 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, 22: 421-437.
- Jiang Q. Q., Bakken L. R. 1999. Comparison of *Nitrosospira* strains isolated from terrestrial environments. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 171-186.
- Kemnitz D., Kolb S., Conrad R. 2007. High abundance of *Crenarchaeota* in temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 442-448.

- Killham K. 1986. Heterotrophic nitrification. V: Nitrification. Prosser J. I. (ed.). Oxford, IRL Press: 117-126.
- Könneke M., Bernhard A. E., De La Torre J. R., Walker C. B., Waterbury J. B., Stahl D. A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437: 543-546.
- Kowalchuk G. A., Stephen J. R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55: 485-529.
- Kowalchuk G. A., Stephen J. R., De Boer W., Prosser J. I., Embley T. M., Woldendorp J. W. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1489-1497.
- Lane D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.). Chichester, Academic Press: 115-175.
- Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G. W., Prosser J. I., Schuster S. C., Schleper C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 442: 806-809.
- McTavish H., Fuchs J. A., Hooper A. B. 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 175: 2436-2444.
- Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G. 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: 695-700.

- Nicol G. W., Glover L. A., Prosser J. I. 2003. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, 5: 152-162.
- Nicol G. W., Webster G., Glover L. A., Prosser J. I. 2004. Differential response of archaeal and bacterial communities to nitrogen inputs and pH changes in upland pasture rhizosphere soil. *Environmental Microbiology*, 6: 861-867.
- Nicol G. W., Schleper C. 2006. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology*, 14: 207-212.
- Nicol G. W., Tscherko D., Chang, L. Hammesfahr, U., Prosser J. I. 2006. Crenarchaeal community assembly and microdiversity in developing soils at two sites associated with deglaciation. *Environmental Microbiology*, 8: 1382-1393.
- Nicol G. W., Leininger S., Schleper C., Prosser J. I. 2008. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology*, 10: 2966-2978.
- Nicolaisen M. H., Ramsing N. B. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 50: 189-203.
- Nugroho R. A., Röling W. F. M., Laverman A. M., Verhoef H. A. 2007. Low nitrification rates in acid scots pine forest soils are due to pH-related factors. *Microbial Ecology*, 53: 89-97.
- Ochsenreiter T., Selezi D., Quaiser A., Bonch-Osmolovskaya L., Schleper C. 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology*, 5: 787-797.
- Offre P., Prosser J. I., Graeme N. W. 2009. Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene. *FEMS Microbiology Ecology*, 70: 99-108.

- Op den Camp H. J. M., Jetten M. S. M., Strous M. 2007. Anammox. V: Biology of the nitrogen cycle. Bothe H., Ferguson S. J., Newton W. E. (eds.). Amsterdam, Elsevier B.V.: 245-262.
- Prosser J. I. 2007. The ecology of nitrifying bacteria. V: Biology of the nitrogen cycle. Bothe H., Ferguson S. J., Newton W. E. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 223-243.
- Prosser J. I., Nicol G.W. 2008. Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology*, 10: 2931-2941.
- Purkhold U., Pommerening-Röser A., Juretschko S., Schmid M. C., Koops H. P., Wagner M. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5368-5382.
- Rothauwe J. H., Witzel K. P., Liesack W. 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4704-4712.
- Schleper C., Jurgens G., Jönascheit M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 479-488.
- Schloss P. D., Handelsman J. 2004. Status of the microbial census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 686-691.
- Stephen J. R., McCaig A. E., Smith Z., Prosser J. I., Embley T. M. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4147-4154.
- Strous M., Fuerst J. A., Kramer E. H. M., Logemann S., Muyzer G., Van De Pas-Schoonen K. T., Webb R., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400: 446-449.

- ter Braak C. J. F., Šmilauer P. 2002. CANOCO reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5). Ithaca, Microcomputer Power: 500 str.
- Tilman D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R. Schindler D., Schlesinger W. H., Simberloff D., Swackhamer D. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292: 281-284.
- Tourna M., Freitag T., Nicol. G. W., Prosser J. I. 2008. Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environmental Microbiology*, 10: 1357-1364.
- Treusch A. H., Leininger S., Kietzin A., Schuster S. C., Klenk H. P., Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and *Amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology*, 7: 1985-1995.
- Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A., Wu D., Paulsen I. P., Nelson K. E., Nelson W., Fouts D. E., Levy S., Knap A. H., Lomas M. W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y-H., Smith H. O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304: 66-74.
- Vitousek P. M., Aber J. D., Howarth R. W., Likens G. E., Matson P. A., Schindler D. W., Schlesinger W. H., Tilman D. G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecological Applications*, 7: 737-750.
- Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H. P., Schleifer K. H. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 251-264.
- Ward B. B., Devol A. H., Rich J. J., Chang B. X., Bulow S. E., Naik H., Pratihary A., Jayakumar A. 2009. Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea. *Nature*, 461:78-81.

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.

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

Wrage N., Velthof G. L., Van Beusichem M. L., Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1723-1732.

Wuchter C., Abbas B., Coolen M. J. L., Herfort L., Van Bleijswijk J., Timmers P., Strous M., Teira E., Herndl G. J., Middelburg J. J., Schouten S., Damsté J. S. S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12317-12322.

ZAHVALA

Rad bi se zahvalil prof. dr. Jimu I. Prosserju in dr. Graeme W. Nicolu za topel sprejem v skupino, za številne nasvete in ideje tekom dela. Rad bi se zahvalil tudi ostalim članom skupine. Dr. Cecile Rangin za mentorstvo pri delu, nasvete, znanstveno kot tudi moralno podporo in stalni optimizem. Dr. Pierru Offreju in dr. Danielu Verhammenu za uvajanja v laboratorij, uvajanju v metode RT-PCR, DGGE, predvsem pa skupnemu laboratorijskemu druženju v poznih večernih urah. Velika zahvala pa tudi Zeni Smith, ki je vedno poskrbela za odlično vzdušje v laboratoriju.

Zahvalil bi se mentorici prof. dr. Ines Mandić Mulec za predlog opravljanja diplomskega dela na Škotskem in za izreden optimizem ter vzpodbudo pri pisanju diplomskega dela.

Zahvalil bi se tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, ki so mi z nasveti in tudi drugače pomagali pri izvedbi diplomskega dela. Še največja zahvala delovni mentorici Špeli Höfferle.

Zahvala tudi prof. dr. Gorazdu Avguštinu za zelo hitro recenziranje diplomskega dela.

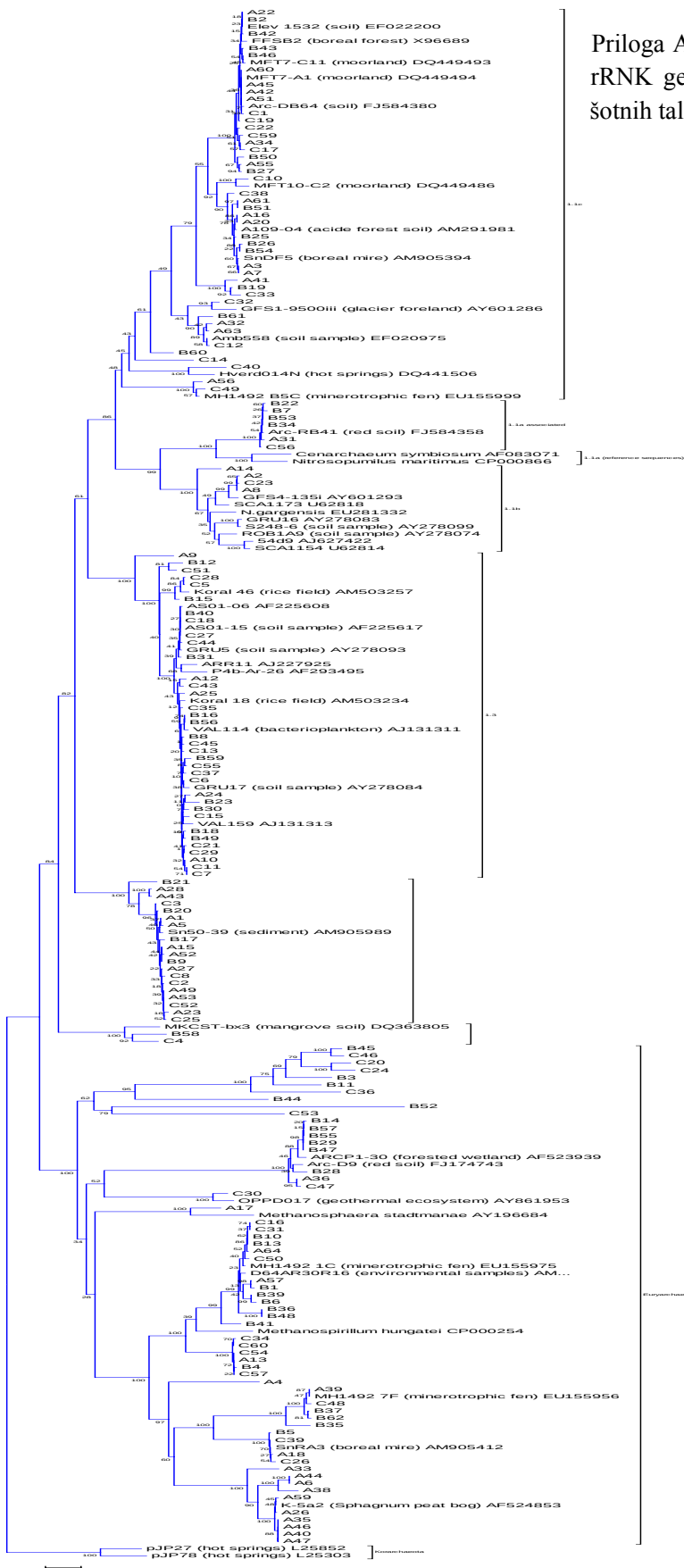
Posebna zahvala gre staršem in sestri za podporo in vzpodbudne besede med študijem in opravljanju diplomskega dela. Najlepša hvala pa tudi Dragani, ki me je spremljala vse dni v času študija in v najtežjih trenutkih verjela vame.

Nazadnje pa se zahvaljujem prijateljem, sošolcem in najboljšim sostanovalcem Tjaši, Jerneju in Damjanu za vse trenutke prostega časa in ki so naredili študijska leta nepozabna.

Hvala!

PRILOGE

Priloga A. Filogenetska analiza arhejskih 16S rRNK genskih sekvenc pridobljenih iz kisljih šotnih tal Ljubljanskega barja



Priloga B: Filogenetska analiza krenarhejskih *amoA* genskih sekvenc pridobljenih iz mikrokozemskih tal

