

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina ZAKOTNIK

**SESTAVA IN AKTIVNOST BAKTERIJSKIH  
MIKROBNIH ZDRUŽB V SEDIMENTIH  
POSTOJSKE JAME STARIH DO 700.000 LET**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina ZAKOTNIK

**SESTAVA IN AKTIVNOST BAKTERIJSKIH MIKROBNIH ZDRUŽB  
V SEDIMENTIH POSTOJNSKE JAME STARIH DO 700.000 LET**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE STRUCTURE AND ACTIVITY OF BACTERIAL MICROBIAL  
COMMUNITIES IN UP TO 700.000 YEARS OLD SEDIMENTS OF  
THE POSTOJNA CAVE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Blaža Stresa, za recenzenta pa prof. dr. Gorazda Avgušтина.

Mentor: doc. dr. Blaž Stres

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: doc. dr. Blaž STRES  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Zakotnik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.26 + 579.8: 551.435.84 (043) = 163.6
- KG jamska mikrobiologija/ sedimenti/ tekstura/ Postojnska jama/ mikrobna raznolikost/ biološka raznovrstnost/ mikrobna aktivnost/ mikrobne združbe/ bakterije/ klonske knjižnice/ 16S rRNK/ PCR/ Bionumerics/ ImageJ/ RDP II/ PAST/ CANOCO
- AV ZAKOTNIK, Tina
- SA STRES, Blaž (mentor)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2011
- IN SESTAVA IN AKTIVNOST BAKTERIJSKIH MIKROBNIH ZDRUŽB V SEDIMENTIH POSTOJSKE JAME STARIH DO 700.000 LET
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 62 str., 12 sl., 10 pregl., 12 pril., 70 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Sedmim vzorcem sedimentov in stenskih tvorb iz Postojnske jame, ki smo jih odvzeli v delu Spodnjega Tartarusa, smo ugotavljali trajne fizikalno kemijske parametre (C, N, gostota, vlažnost, poroznost) in prostorsko razporeditev. V vzorcih smo izmerili mikrobno aktivnost z metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina, sestavo mikrobne združbe pa smo ugotavljali s tipizacijo z LH PCR (*angl.* length heterogeneity polymerase chain reaction). Iz sedimenta starega ~20.000 let, stenskih tvorb Vermikuliti in jamskih tal smo pripravili klonske knjižnice bakterijskih genov za 16S rRNK. Pridobili smo 285 uporabnih sekvenc, ki smo jih v bazi RDP II primerjali z že znanimi in dostopnimi ribosomskimi sekvencami. Največji delež sekvenc je pripadal bakterijskemu deblu *Proteobacteria*, manjši deleži pa deblom *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, OD1, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* in *Nitrospira*. Večji delež so predstavljale tudi neuvrščene bakterije, manjšega pa neznani organizmi. Primerjava knjižnic Postojnske jame s knjižnicami drugih jam in drugimi okolji (tla, sedimenti,...) s programom PAST je pokazala, da so si knjižnice sedimenta jamskih tal, stenskih tvorb Vermikuliti in Pajsarjeva jama po sestavi podobne, med tem ko knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let izstopa in je precej oddaljena od drugih primerjanih knjižnic. Izmerjene podatke smo uporabili v statistični analizi ugotavljanja deležev variabilnosti v sestavi bakterijske mikrobne združbe in aktivnosti s programom CANOCO. Okoljski parametri ter kovariabilnost med njimi so razložili 12,7 %, 16,9 % in 70,4 % variabilnosti aktivnosti in 11,3 %, 12,5 % in 76,2 % sestave mikrobne združbe. Starost sedimentov je bila ključna za razlago sestave mikrobnih združb, poroznost pa za razlago aktivnosti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.26 + 579.8: 551.435.84 (043) = 163.6
- CX cave microbiology/ sediments/texture/ Postojna cave/ microbial diversity/  
biodiversity/ microbial activity/ microbial communities/ bacteria/clone libraries/  
16S rRNA/ PCR/ Bionumerics/ ImageJ/ RDP II/ PAST/ CANOCO
- AU ZAKOTNIK, Tina
- AA STRES, Blaž (supervisor)/ AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology
- PY 2011
- TI THE STRUCTURE AND ACTIVITY OF BACTERIAL MICROBIAL  
COMMUNITIES IN UP TO 700.000 YEARS OLD SEDIMENTS OF THE  
POSTOJNA CAVE
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 62 p., 12 fig., 10 tab., 12 ann., 70 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The permanent physicochemical parameters (C, N, density, humidity, porosity) and the spatial distribution to seven sediment and wall formation samples from the Postojna Cave, obtained in the Lower Tartarus were determined. The microbial activity in the samples was measured by radioactive leucin incorporation, and the microbial community structure was analyzed by LH PCR typing. 16S rRNA clone libraries from a ~20,000-year-old sediment, the Vermiculite wall formation and the cave floor were prepared. 285 useful sequences which were then compared to the nearest related groups in the RDP II base were acquired. The major share of sequences belonged to the bacterial phylum *Proteobacteria*, whereas the minority belonged to phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *ODI*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* and *Nitrospira*. There was also a considerable number of sequences from unknown bacteria and a low proportion from organisms of unknown roots. The comparison of the Postojna Cave libraries with those of other caves and environments (soils, sediments), using the PAST programme, showed that libraries from the cave sediment, the Vermiculite wall formation and the Pajsarjeva jama are similar, whereas the 20,000-year-old sediment library stands out and differs considerably from other compared libraries. The measured data were then processed by the CANOCO programme in order to perform the statistical analysis defining the shares of variability in the bacterial microbial community structure and activity. The environmental and spatial parameters, and the covariability among them explained 12,7 %, 16,9 % and 70,4 % of the activity variability, and 11,3 %, 12,5 % and 76,2 % of microbial community structure variability. The age of the sediments was crucial for the interpretation of the microbial units structure, whereas porosity was the key factor for the activity explanation.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG</b>	<b>X</b>
<b>KRAJŠAVE IN SIMBOLI</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE	3
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1 KRAŠKE JAME	4
2.2 SEDIMENTI POSTOJNSKEGA JAMSKEGA SISTEMA	5
2.3 AKTIVNOST BAKTERIJSKIH MIRKOBNIH ZDRUŽB V JAMAH	9
<b>2.3.1 Merjenje mikrobne aktivnosti z metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina</b>	<b>10</b>
2.4 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE V KRAŠKIH JAMAH	11
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>14</b>
3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV	14
3.2 PROSTORSKA PORAZDELITEV VZORCEV	15
3.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE VSEBNOSTI CELOKUPNEGA OGLJIKA IN DUŠIKA	15
3.4 IZRAČUN GOSTOTE IN POROZNOSTI VZORCEV	16
3.5 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI DELCEV IN TEKSTURE VZORCEV S PROGRAMOM ImageJ	16
3.6 PRIPRAVA PREPARATOV ZA DIREKTNO ŠTETJE CELIC Z MIKROSKOPOM	17
3.7 UGOTAVLJANJE HETEROGENOSTI DOLŽIN POMNOŽKOV REVERZNE RAKCIJE S POLIMERAZO	18

<b>3.7.1 Izolacija DNK s kompletom MoBio soil DNA extraction kit</b>	<b>18</b>
<b>3.7.2 Pomnoževanje delov gena 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</b>	<b>19</b>
<b>3.7.3 Čiščenje produktov PCR s kompletom High pure PCR product kit</b>	<b>20</b>
3.8 KOLONIRANJE	21
<b>3.8.1 Priprava kompetentnih celic</b>	<b>21</b>
<b>3.8.2 Priprava inserta z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</b>	<b>22</b>
<b>3.8.3 Čiščenje produkta PCR s kompletom Qiaquick Gel Extraction kit</b>	<b>23</b>
<b>3.8.4 Kloniranje v vektor pJET 1.2</b>	<b>23</b>
<b>3.8.5 Transformacija</b>	<b>24</b>
<b>3.8.6 Pikiranje</b>	<b>25</b>
<b>3.8.7 Pomnoževanje insertov vključenih v vektor pJET 1.2 z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) – colony PCR</b>	<b>25</b>
<b>3.8.8 Začetni oligonukleotidi</b>	<b>26</b>
3.9 OBDELAVA IN PRIMERJAVA SEKVENC 16S rRNK	27
3.10 MIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJSKIH ZDRUŽB - INKORPORACIJA RADIOAKTIVNO OZNAČENEGA LEUCINA	27
3.11 IZRAČUN DELEŽA VARIABILNOSTI IN AKTIVNOSTI BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH PARAMETROV	28
3.12 GOJIŠČA, PUFRI, RAZTOPINE	29
<b>3.12.1 Gojišče Luria Bertani (LB) z ampicilinom (Amp)</b>	<b>29</b>
<b>3.12.2 Pufer Luria Bertani za zamrzovanje sevov z dodanim ampicilinom (LB freezing buffer Amp)</b>	<b>29</b>
<b>3.12.3 Pufer PBS (Phosphate buffered saline)</b>	<b>30</b>
<b>3.12.4 Gelska elektroforeza</b>	<b>30</b>
<b>4 REZULTATI</b>	<b>32</b>
4.1 DELEŽ CELOKUPNEGA DUŠIKA (N) IN OGLJIKA (C)	32
4.2 GOSTOTA VZORCEV IN POROZNOST	34
4.3 VELIKOST DELCEV IN TEKSTURA VZORCEV	36
4.4 DOLOČITEV KONCENTRACIJE BAKTERIJ V VZORCIH JAMSKIH SEDIMENTOV	37

4.5	PRIMERJAVA SESTAVE MIKROBNIH ZDRUŽB V SEDIMENTIH POSTOJSKE JAME Z METODO LH PCR	37
4.6	TAKSONOMSKA UVRSTITEV SEKVENC IN PRIMERJAVE KLONSKIH KNJIŽNIC	39
4.7	INKORPORACIJA RADIOAKTIVNO OZNAČENEGA <sup>14</sup> C-LEUCINA	43
4.8	DELEŽ VARIABILNOSTI SESTAVE IN AKTIVNOSTI BAKTERIJSKIH MIKROBNIH ZDRUŽB V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH PARAMETROV	45
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>47</b>
5.1	RAZPRAVA	47
5.2	SKLEPI	51
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>54</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Pregled barve, sestave, mineralne sestave in starosti sedimentov ter fosilnih ostankov v sedimentih Postojnske jame (Zupan Hajna in sod., 2008a: 70; Zupan Hajna in sod., 2008b: 245).	8
<b>Preglednica 2:</b> Program LH PCR za pomnoževanje dela 16S rRNK.	20
<b>Preglednica 3:</b> Program PCR za pomnoževanje insertov za kloniranje.	22
<b>Preglednica 4:</b> Program PCR za preverjanje velikosti insertov vključenih v vektor pJET1.2.	26
<b>Preglednica 5:</b> Začetni oligonukleotidi.	26
<b>Preglednica 6:</b> Sestava agaroznega gela.	31
<b>Preglednica 7:</b> Deleži ogljika in dušika ter izračunana razmerja C/N v sedimentih Postojnske jame.	32
<b>Preglednica 8:</b> Deleži poroznosti in gostota sedimentov Postojnske jame.	35
<b>Preglednica 9:</b> Deleži posameznih bakterijskih skupin zastopanih v knjižnicah sedimenta starega ~20.000 let, stenskih tvorb Vermikulitov in sedimenta na prevojni točki.	40
<b>Preglednica 10:</b> Delež variabilnosti v aktivnosti in sestavi bakterijskih mikrobnih združb.	45

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Postojnsko jamski sistem (Zupan Hajna in sod., 2008a: 68).	6
<b>Slika 2:</b> Mesta vzorčenja v Postojnski jami – S del Spodnjega Tartarusa.	14
<b>Slika 3:</b> Prikaz odvzema vzorcev sedimenta Postojnske jame.	15
<b>Slika 4:</b> Delež dušika v sedimentih Postojnske jame.	33
<b>Slika 5:</b> Delež ogljika v sedimentih Postojnske jame.	33
<b>Slika 6:</b> Razmerja C/N v sedimentih Postojnske jame.	34
<b>Slika 7:</b> Poroznost sedimentov v Postojnski jami.	35
<b>Slika 8:</b> Gostota sedimentov Postojnske jame.	36
<b>Slika 9:</b> Dendrogram podobnosti sestave mikrobnih združb serije A izrisan s programom Bionumerics (Applied Maths, 2010).	38
<b>Slika 10:</b> Dendrogram podobnosti sestave mikrobnih združb serije B izrisan s programom Bionumerics (Applied Maths, 2010).	39
<b>Slika 11:</b> Ordinacija (NM-MDS) klonskih knjižnic iz različnih okolij s programom PAST (Hammer in sod., 2001).	43
<b>Slika 12:</b> Inkorporacija radioaktivno označenega leucina v sedimentih Postojnske jame.	44

## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Prostorski parametri Postojnske jame.

**Priloga B:** Grafični prikaz zastopanosti posameznih debel v sedimentih Postojnske jame.

**Priloga B1:** Klonska knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let.

**Priloga B2:** Klonska knjižnica sedimenta s prevojne točke.

**Priloga B3:** Klonska knjižnica stenskih tvorbo Vermikulitov.

**Priloga C:** Seznam sekvenc 16S rRNK uporabljenih za primerjavo s programom PAST (Hammer in sod., 2001).

**Priloga D:** Povprečne vrednosti DPM in standardnih deviacij – inkorporacija radioaktivno označenega leucina.

**Priloga E:** Podatki za izračun deleža variabilnosti in aktivnosti v bakterijski mikrobnih združbi v sedimentih Postojnske jame.

**Priloga E1:** Podatki za okoljske parametre.

**Priloga E2:** Podatki za aktivnost.

**Priloga E3:** Podatki za prostorske parametre.

**Priloga E4:** Podatki o sestavi mikrobne združbe.

## KRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
Db	gostota ( <i>angl.</i> bulk density)
DNK	deoksiribonukleinska kislina ( <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid, DNA)
Dp	poroznost ( <i>angl.</i> particle density)
DPM	število razpadov na minuto ( <i>angl.</i> disintegration per minute)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina ( <i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
FAM	karboksifluorescein ( <i>angl.</i> carboxyfluorescein)
LH PCR	dolžinska heterogenost verižne reakcije s polimerazo ( <i>angl.</i> length heterogeneity polymerase chain reaction)
NanoSIMS	masna spektrometrija sekundarnih ionov ( <i>angl.</i> secondary ion mass spectrometry)
NM-MDS	NM-MDS ( <i>angl.</i> non metric multidimensional scaling)
NP-MANOVA	neparametrični test razlik ( <i>angl.</i> non parametric multivariate analysis of variance)
PBS	fosfatni pufer ( <i>angl.</i> phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl.</i> polymerase chain reaction)
rDNK	ribosomska DNK ( <i>angl.</i> ribosomal DNA)
RDP II	Ribosomal Database Project II
RNK	ribonukleinska kislina ( <i>angl.</i> ribonucleic acid, RNA)
rRNK	ribosomska RNK ( <i>angl.</i> ribosomal RNA, rRNA)
SIP	stable isotop probing
SSU	majhna podenota ribosoma ( <i>angl.</i> small ribosomal subunit)
TaqPol	polimeraza DNK iz <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borat-EDTA
TCA	trikloroocetna kislina ( <i>angl.</i> trichloroacetic acid)
T-RFLP	polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov ( <i>angl.</i> terminal restriction fragment length polymorphism)
UPGMA	netehtana aritmetična sredina parnih skupin ( <i>angl.</i> unweighted pair-group method, arithmetic mean)

## 1 UVOD

Jame so ekstremno oligotrofna in kompleksna okolja z relativno konstantnimi fizikalno-kemijskimi parametri. Predstavljajo ekstremna okolja za življenje in oblikujejo ekološke niše za močno specializirane mikroorganizme (Schabereiter Gurtner in sod., 2003), ki omogočajo obstoj mikrobne raznolikosti in stabilnost ekosistemov. S proučevanjem jam tako lahko pridobimo poglobljen vpogled v raznolikost mikrobnih združb ter boljše razumevanje vloge in aktivnosti posamezne bakterijske skupine oz. vrste v energijsko okrnjenih in kompleksnih okoljih.

Predvsem zaradi težkega dostopanja do notranjosti jam je do danes o jamskih sedimentih in mikroorganizmih v njih znanega zelo malo. Poleg tega se je velika večina do sedaj opravljenih študij opirala na tradicionalne gojitvene tehnike, kar je močno okrnilo vpogled v mikrobno združbo.

Z uporabo molekularnih tehnik je jamska mikrobiologija dobila nov zagon. Filogenetske študije na nivoju gena za 16S rRНК so razširile razumevanje vloge mikrobne raznolikosti v jamah (Summers Engel in sod., 2004). Odkrite so bile nekatere bakterijske skupine, katerih predstavniki so sposobni razgradnje kompleksnih aromatskih spojin, proizvajajo do sedaj neznane encime, antibiotike ter tumorzavirajoče faktorje. Opisali so tudi številne do takrat neznane bakterijske vrste, katerih pomen in vloga v jamskem ekosistemu še nista pojasnjena. Pomembno je tudi odkritje, da proces mineralne precipitacije in preoblikovanje jamskega okolja ni le produkt kemičnih reakcij, ampak v njem igra pomembno vlogo tudi metabolizem nekaterih odkritih bakterijskih vrst (Barton in Juardo, 2007).

Mikrobno-taksonomskih raziskav jam, tako v svetu kot v Sloveniji, ni veliko. Študije jamskih sedimentov se osredotočajo predvsem na geomorfološke in geološke raziskave z določanjem mineralne sestave in starosti sedimenta. V dosedanjih mikrobioloških raziskavah jam v slovenskem prostoru so večinoma proučevali specifične mikrobne ter jamske strukture s tradicionalnimi gojitvenimi tehnikami (Pašić in sod., 2009). Molekularne tehnike so uporabili Pašić in sodelavci (2009), ki so ugotavljali raznolikost

bakterijskih kolonij s stene Pajsarjeve jame. Mikrobioto jamskih sedimentov v slovenskem prostoru in tudi v svetovnem merilu tako šele spoznavamo.

S pričujočim delom smo želeli z molekularnimi tehnikami primerjati sestavo bakterijskih mikrobnih združb v različnih sedimentnih vzorcih odvzetih v za javnost zaprtem rovu v Postojnski jami ter na podlagi inkorporacije radioaktivno označenega leucina ugotoviti mikrobno aktivnost. Z ugotavljanjem nekaterih klasičnih okoljskih in prostorskih parametrov v transektu jamskih sedimentov pa smo ugotavljali, ali in kako so dejavniki okolja povezani s sestavo bakterijske mikrobne združbe in njeno aktivnostjo.

## 1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Pri delu smo se osredotočili na ugotavljanje sestave bakterijskih mikrobnih združb na nivoju gena za 16S rRNK in primerjavo le teh med vzorci, ter ugotavljanje mikrobne aktivnosti bakterijskih mikrobnih združb z metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina. Poleg tega smo želeli opisati tudi velikost delcev in teksturo vzorcev, fizikalno kemijske dejavnike okolja (C, N, poroznost, gostota tal, vlažnost), vpliv prostorske razporeditve mest vzorčenja ter ugotoviti, kakšen je njihov vpliv na sestavo in aktivnost bakterijske mikrobne združbe v teh sedimentih.

Pred začetkom dela smo postavili sledeče delovne hipoteze:

- $H_0$ : Sestava in aktivnost mikrobnih združb se med vzorci ne bosta signifikantno razlikovali.
- $H_0$ : Okoljski parametri se med posameznimi vzorci ne bodo signifikantno razlikovali.
- $H_1$ : Okoljski parametri v starejših sedimentih bodo signifikantno različni. Aktivnost mikrobnih združb v starejših sedimentih bo nižja od aktivnosti v mlajših sedimentih. Sestava mikrobnih združb se bo med različno starimi vzorci sedimenta razlikovala.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KRAŠKE JAME

Kraško površje se izoblikuje na področjih bogatih z apnencem ali dolomitom. Slednja se pod vplivom padavin in rek raztapljata in preoblikujeta v podzemeljski svet podoben labirintu.

Apnenec se raztoplja zaradi šibke karbonatne kisline  $H_2CO_3$ , ki nastane ob reakciji vode s  $CO_2$  iz zraka in razpadajočega rastlinskega materiala v zemlji. V enakem procesu nastajajo tudi jamske formacije. Le te so produkt nalaganja depozitov raztopljenega kalcijevega karbonata, ki v procesu precipitacije počasi oblikuje kapnike. Poleg tega pomembno vlogo pri oblikovanju jamskega okolja igrajo tudi mikrobne vrste, ki v interakciji z minerali pomagajo pri formaciji kapnikov (Barton in Jurado, 2007), povzročajo pa tudi njihovo degradacijo (Douglas, 2005).

Prostori v jamah so lahko med nastankom končnega jamskega sistema večkrat zapolnjeni z različnimi sedimenti in vodo, pogosto pa tudi zamrznejo in odmrznejo. Vse to omogoča nalaganje različnih vrst depozitov in sedimentacijo materiala v različnih geoloških obdobjih. V grobem jamske sedimente razdelimo na kemične in klastične sedimente. Klastični sedimenti v jame vstopajo z mehanskim prenosom, kemični pa nastajajo na mestu samem v procesu precipitacije. Znotraj klastične skupine delimo sedimente na alohtone in avtohtone, kemične pa razdelimo glede na mineralno sestavo. Jame sestavlja več kot 255 mineralov, med katerimi so najpomembnejši  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $HCO_3^-$  in  $SO_4^{2-}$ , ki pa se zaradi oksidne narave jam, z nekaterimi izjemami, pojavljajo v oksidirani obliki (White, 2007).



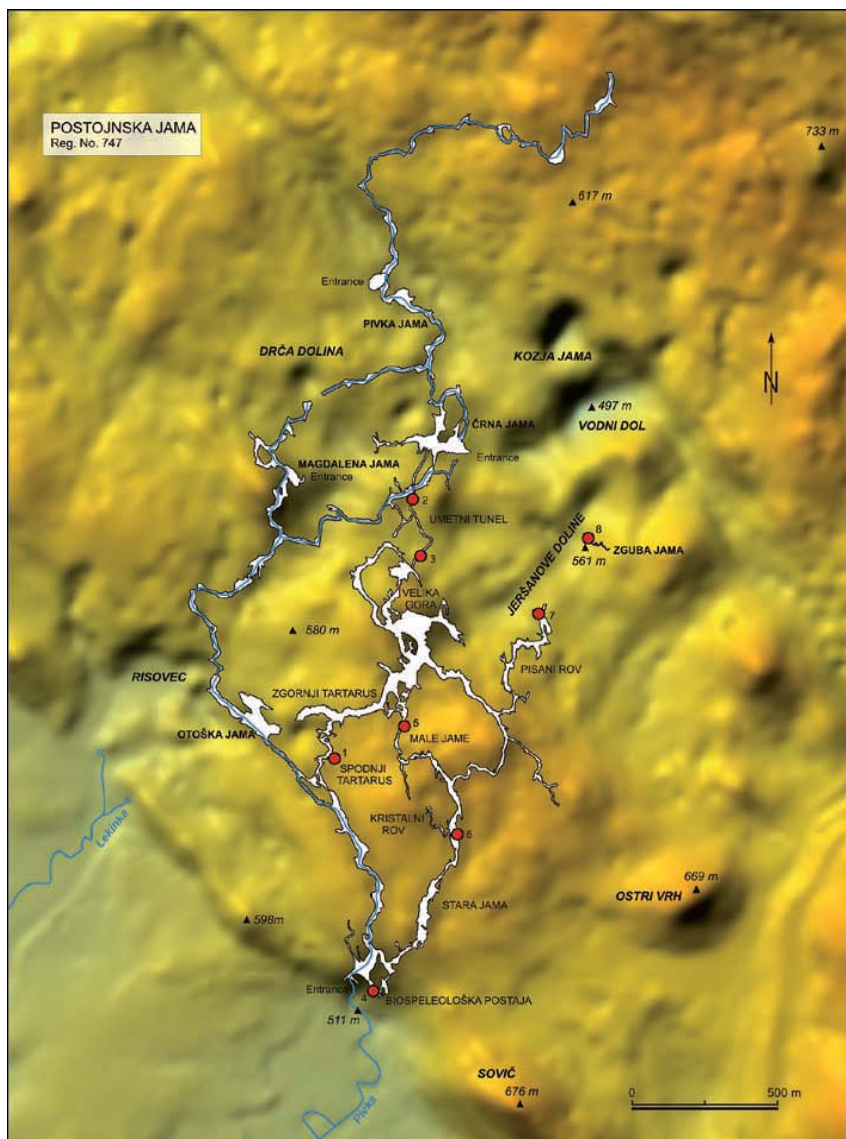
## 2.2 SEDIMENTI POSTOJNSKEGA JAMSKEGA SISTEMA

Slovenski kras predstavlja 40 % celotnega geografskega površja Slovenije. Glavno kraško področje je Dinarski kras, ki se razprostira od srednjega do južnega dela Slovenije. Grajen je večinoma iz apnenca in je podvržen močni krasifikaciji, kar se kaže v obstoju številnih uval, dolin, jamskih vhodov, odprtih in podzemnih jam, presihajočih jezer, rekah ponikalnicah, itd.

Najbolj poznan del Dinarskega krasa je Postojnski kras. Lociran je med dvema visokima kraškima planotama Hrušica in Javornik ter dvema nižjima reliefnima enotama Pivška kotlina na zahodu in Planinsko polje na severovzhodu (Zupan Hajna in sod., 2008a). Tektonsko preoblikovanje in nalaganje sedimenta na to področje se je pričelo v Eocenu/Oligocenu in zaključilo v obdobju med Miocenom ter Pleistocenom (Zupan Hajna in sod., 2008b).

Poglavitni del Postojnskega krasa je Postojnska jama ( $45^{\circ} 46' 57,79''$  S,  $14^{\circ} 12' 13,18''$  V). Pokrita je s približno 800 metrov debelo plastjo apnenca. Celoten jamski sistem je dolg 20,5 kilometra, zajema številne prehode in dvorane ter predstavlja najdaljši jamski sistem v Sloveniji. Glavni dejavnik v procesu oblikovanja jamskega sistema predstavlja reka Pivka, ki še danes občasno poplavlja dele jame.

Sistem je sestavljen iz Spodnjega Tartarusa, Umetnega tunela I in II, Biospeleološke postaje, Male jame, Stare Jame in Pisanega rova. Notranjost je bogata s kapniki ter zapolnjena z aluvialnimi depoziti, glino, meljem, peskom, prodom, itd., vhod jame pa vsebuje mešanico pobočnega materiala in fluvialnih depozitov (Zupan Hajna in sod., 2008b).



Slika 1: Postojnsko jamski sistem (Zupan Hajna in sod., 2008a: 68).

Starost ter mineralno sestavo sedimenta v posameznih delih Postojnskega jamskega sistema so Zupan Hajna in sodelavci (2008a) ugotavljali z  $\alpha$ -spektrometrijo s predhodno ločitvijo urana in torija (Th/U) iz karbonatnih vzorcev s standardnimi kemičnimi protokoli (Ivanovich in Harmon, 1992 cit. po Zupan Hajna in sod., 2008a) ter z analizo prašnih difrakcij z X-žarčenjem (X-ray). Starost večine sedimentov je bila med 350.000 in 780.000 leti. Najstarejši sediment so ugotovili v vzorcu Umetnega tunela I med 990.000 in 2.150.000 leti. Mineralno sestavo sedimentov so ugotavljali le v Spodnjem Tartarusu ter

Umetnem tunelu I in II. Izkazalo se je, da so v vseh vzorcih prisotni kvarc, klorit, kaolinit ter muskovit.

Natančen opis barve, sestave, mineralne sestave, najdenih fosilov in starost posameznega sedimenta je prikazan v **Preglednici 1**.

**Preglednica 1:** Pregled barve, sestave, mineralne sestave in starosti sedimentov ter fosilnih ostankov v sedimentih Postojnske jame (Zupan Hajna in sod., 2008a: 70; Zupan Hajna in sod., 2008b: 245).

Mesto vzorčenja	Barva sedimenta		Sestava sedimenta	Mineralna sestava			Fosili	Starost sedimenta [Ma]	
								min.	max.
Spodnji Tartarus	spodnji profil	zgornji profil	glina, mulj, nanešena v laminah, mešana s peskom, na S delu preparele plasti apnenca	rdeča glina	rumena glina	rjava glina			< 0.78
	rdeče rjav	rumeno, rumeno rjav, svetlo rjav		kvarc (D), klorit, kaolinit, muskovit, feldšpar	kvarc (D), klorit, kaolinit, muskovit, montmorilonit, feldšpar, kalcit	kvarc, klorit, kaolinit (S), muskovit, montmorilonit (S), feldšpar			
Umetni tunel I	rjavo siv		fluvialni sedimenti, grobo zrnat, okroglo zrnat pesek	kvarc (D), klorit, muskovit, mikrokлина, plagioklas				< 0.99	> 2.15
Umetni tunel II	rumeno rjav		glina nanešena v laminah, vezana s fino do srednje zrnatim peskom	kvarc (D), klorit (S), kaolinit (S), muskovit, feldšpar, kalcit, goetit (S)				ni podatkov	ni podatkov
Biospeološka postaja	rdečkast		glina, prod, apnenec, mulj, pesek, flišne komponente						< 0.78
Male jame	zeleno siv zgornji del, prehod v rdeče rjavo barvo, svetlo rumeno rjav spodnji del		glina, mulj, peščeni prod v laminah in trakovih, fino do srednje zrnat pesek mešan z glino, muljem in flišem						> 0.78
Stara jama	sivo do svetlo rjav		peščeni prod, muljasto peščena sestava, v laminah				okostje jamskega medveda		< 0.78
Pisani rov	rumeno rjav, olivno zelen na robu		mulj, glina v laminah					> 0.35	< 0.78

D = dominanten, S = v sledovih

### 2.3 AKTIVNOST BAKTERIJSKIH MIRKOBNIH ZDRUŽB V JAMAH

Zaradi odsotnosti fotosinteze so jame odrezane od primarnega energijskega vira, ki podpira življenje na površini (Barton, 2006). Hranila v jamo prihajajo preko atmosferskih plinov in rek, ki s svojim tokom prinašajo aromatske in poliaromske spojine iz površinskih tal. Delno se vnašajo tudi z obiski človeka in živali ter jamske favne (Mulec, 2008).

Jame predstavljajo idealno okolje za proučevanje mikrobne adaptacije na stradanje, saj hranila le redko dosežejo več kot 0,5 mg TOC na liter (Barton in Juado, 2007). Mikroorganizmi se na stradanje prilagodijo tako, da primarno produkcijo in fiksacijo ogljika zamenjajo z alternativnimi potmi. Prevladujeta predvsem kemoavtotrofija in kemolitoavtotrofija. Energijo tako pridobivajo z razgradnjo površinskih kompleksnih aromatskih spojin, oksidacijo reduciranih kovin iz jamskih kamnin, fiksacijo hlapnih organskih in ogljikovih dioksidov ter dušika iz zraka (Barton in Jurado, 2007).

V jamah so, v nasprotju s pričakovanji, našli relativno veliko različnih mikrobnih vrst, kar omogoča postavitev hipoteze, da se v stradajočem jamskem okolju izoblikujejo vzajemne interakcije, ki podpirajo rast kompleksnih mikrobnih združb (Barton in Jurado, 2007). Zaradi kompleksne narave organskega ogljika in inorganskih virov hranil ni verjetno, da bi bile vse mikrobne vrste v jamskem prostoru zmožne vršiti čisto vse potrebne reakcije za popolno razgradnjo hranil in pridobivanje energije za lastno rast (Jüttner, 1984).

Mikrobna aktivnost se v jamah kaže na različne načine. Nekateri mikrobni procesi lahko preoblikujejo mineralno strukturo jamskih površin z razgradnjo kamenin, spet drugi pomagajo pri nastanku sekundarnih produktov  $\text{CaCO}_3$  z mineralizacijo na površini celic. Obstoje mikrobne aktivnosti v jami lahko opazimo v obliki bakterijskih kolonij na površju, v nenavadnem obarvanju kapnikov, korozijskih ostankih in biofilmih. Najbolj zanimive so tvorbe imenovane »jamsko srebro«, »jamsko zlato« in kalcitno jamsko mleko, ki jih mikroorganizmi pomagajo tvoriti v interakciji z jamskimi minerali, t.i. Vermikuliti, katerih nastanek še ni pojasnjen. Zanimiv je tudi pojav nekaterih cianobakterij in mikroalg na

stenah v notranjosti jam, ki so sposobne preživeti tudi v razmerah z nižjo intenziteto svetlobe, kot jo običajno potrebujejo za vršitev fotosinteze zunaj. Še najboljše pa je mikrobna aktivnost proučena v guanu, živalskih iztrebkih in mrtvih živalih (Mulec, 2008; Tkavc, 2007).

### **2.3.1 Merjenje mikrobne aktivnosti z metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina**

Metodo je prvi opisal Kirchman s sodelavci (1985). Temelji na vstavljanju radioaktivno označenega leucina v bakterijske proteine. Je zelo občutljiva metoda, saj proteini gradijo večji del bakterij, in je tako direktno povezana z nastajanjem biomase (Kirchman, 2001). Metodo rutinsko uporabljajo v vodni ekologiji, v zadnjem času pa jo vedno bolj pogosto uporabljajo tudi pri analizi vzorcev tal in sedimentov.

Bååth (1994) je metodo optimiziral za meritve bakterijske aktivnosti in jo modificiral tako, da je bakterije iz vzorcev tal ekstrahirale s homogenizacijsko-centrifugalnim postopkom. S centrifugiranjem na nizkih obratih se odstrani večina večjih delcev (Bakken, 1985). Postopek vnosa radioaktivnega leucina so modificirali tako, da so filtracijsko metodo zamenjali s centrifugalno metodo (Bååth in sod., 2001).

Z metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina lahko ugotavljamo toleranco mikroorganizmov na kovine, toksine, spremembo pH, temperature, vrste in koncentracije hranil. V praksi uporabljajo številne različice te metode. Namesto radioaktivno označenega leucina lahko uporabimo radioaktivno označen timidin, ki se vstavlja v DNK mikroorganizmov,  $^{14}\text{C}$ -acetat, ki se vstavlja v ergosterol specifičen za glive, itd. Glavna pomanjkljivost timidina je približno desetkrat slabša detekcija v primerjavi z leucinom.

## 2.4 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE V KRAŠKIH JAMAH

Mikrobiološka raziskovanja jam so do nedavnega večinoma temeljila na proučevanju bakterijskih in evkariontskih združb z gojitvenimi tehnikami. V zadnjem času pa se (predvsem za ohranjanje kulturne dediščine) pojavljajo študije, ki temeljijo na analizi genov za 16S rRNK, kar omogoča bolj natančen vpogled v sestavo bakterijskih mikrobnih združb v kompleksnem jamskem okolju (Portillo in sod., 2008). Študije se po večini osredotočajo na različne mikrobne strukture kot so biofilmi, mikrobne preproge, vidne bakterijske kolonije, itd.

V študijah, ki so jih objavili Portillo in sodelavci (2008) ter Summers Engel in sodelavci (2009) so z molekularnimi pristopi analizirali bakterijsko združbo različnih vzorcev. Prva študija se je nanašala na vzorce odvzete s paleolitskih slik na stenah jame Altamira (Španija), druga pa na mikrobne preproge v jami Lower Kane (ZDA). Raznolikost bakterijske mikrobne združbe je bila veliko večja v mikrobnih preprogah. V obeh študijah je bilo najbolj pogosto zastopano deblo *Proteobacteria*, ugotovili pa so tudi prisotnost debel *Planctomycetes*, *Acidobacteria* in *Actinobacetrria*.

V študiji jame Altamira so poleg že omenjenih debel ugotovili še zelene nežveplove bakterije ter deblo *Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides* (CFB). V jami Lower Kane pa so sekvence izbranih klonov uvrstili še v debela *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Verrucomicrobia* in *Nitrospirae*.

Bastian in sodelavci (2008) so se v svoji študiji osredotočili na iskanje potencialno patogenih mikroorganizmov v jamskih okoljih. Iz različnih mikrookolij jame Lascaux (Francija) so odvzeli devet vzorcev v obliki mikrobnih biofilmov ter s kloniranjem in sekvenciranjem ugotovili 696 bakterijskih in 607 evkariontskih sekvenc. Dobljeni rezultati so pokazali, da je kar 45,1 % sekvenc podobnih sekvencam potencialno patogenih mikroorganizmov. Najpogosteje ugotovljeni bakterijski vrsti sta bili *Ralstonia mannitolilytica* in *Ralstonia pickettii*, našli pa so tudi 19 sekvenc podobnih sekvencam

*Legionella* s patogenimi vrstami *Legionella pneumophila*, *Legionella jordanis* in *Legionella oakridgensis* ter predstavnike rodov *Pseudomonas*, *Afipia*, itd. Med evkariontskimi sekvencami pa je največji delež pripadal praživali *Nuclearia delicatula*, ki bi lahko služila kot rezervoar za patogene bakterijske vrste.

Barron in sodelavci (2010) so iz dveh vzorcev jamskih sedimentov jame Blowing Spring (ZDA) izolirali DNK ter s kloniranjem in sekvenciranjem ugotovili sedem znanih ter dve neznani bakterijski debli. Kot dominantno deblo so opredelili deblo *Proteobacteria* (43 %), sledila pa so mu debela *Planctomycetales* (12 %), *Actinobacteria* (9 %), *Gemmatimonadetes* (9 %), *Firmicutes* (5 %), *Chloroflexi* (5 %) in *Acidobacteria* (4 %), neznani debli pa sta predstavljali po 6 % celotne bakterijske združbe.

Tudi v Sloveniji že nekaj časa potekajo mikrobiološke raziskave slovenskega krasa, vendar jih večina temelji na uporabi gojitvenih tehnik. Mulec in sodelavci (2002) so izolirali in gojili mikroorganizme iz vzorcev preperelega apnenca, jamskega srebra in jamske ponvice jame Pečina v Borštu, preperelega apnenca Martinske jame in kalcitnega jamskega mleka iz Snežne jame. Gerič in sodelavci (2004) pa so ugotavljali raznovrstnost bakterij iz vzorcev prenikle vode iz Škocjanskih jam. Obe študiji sta na podlagi morfoloških in biokemijskih lastnosti izolatov ugotavljali raznolikost mikrobnih združb. V obeh študijah so prevladovali po Gramu negativne bakterije, izolirali pa so tudi seve, ki producirajo violacein. V prvem primeru so bili sevi najbolj podobni bakterijam iz rodu *Chromobacter*, v drugem pa *Iodobacter* in vrsti *Janthinobacterium viridum*. Mulec in sodelavci (2002) so iz preperelega apnenca izolirali tudi glivo, ki so jo na podlagi morfoloških karakteristik in sekvenčnih podatkov uvrstili v skupino *Cladosporium herbarum*.

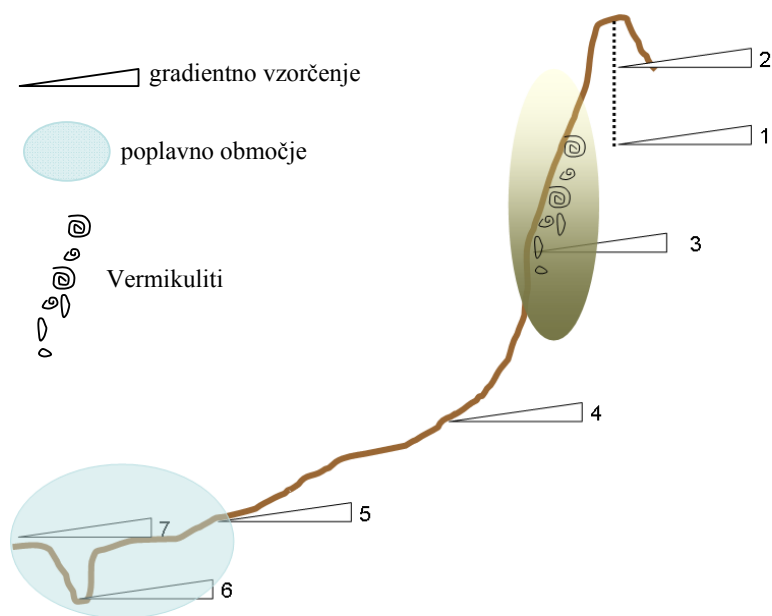
Molekularne tehnike so bile do sedaj v slovenskem kraškem prostoru uporabljene le v študiji, ki so jo opisali Pašić in sodelavci (2009). Iz vzorcev odvzetih s sten Pajsarjeve jame so izolirali DNK ter s PCR in sekvenciranjem ugotavljali bakterijsko raznolikost. Vzorci so zajemali mešanico belih, rumenih, sivih, sivomodrih in roza makroskopskih kolonij. Kot najbolj zastopano deblo se je, tako kot pri drugih podobnih študijah, pojavilo deblo *Proteobacteria*, sledila pa so bakterijska debela *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes* in *Nitrospirae*.



Kljub temu, da so v zadnjem času mikrobiološka raziskovanja jam v porastu, še vedno ne vemo veliko o sestavi bakterijskih mikrobnih združb v jamskih sedimentih, njihovi vlogi pri sami sedimentaciji, načinu razgradnje materiala in metabolizmu, medsebojnem odnosu in vnosu energije v celoten jamski sistem.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV



**Slika 2:** Mesta vzorčenja v Postojnski jami – S del Spodnjega Tartarusa. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljenno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljenne struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljenno območje).

Vzorčenje jamskega sedimenta v severnem delu Spodnjega Tartarusa (45°47'23.16" S, 14°12'09.72" V) v Postojnski jami je potekalo 30. oktobra 2009. Vzorce smo aseptično odvzeli na sedmih različnih mestih z 2 ml brizgo z odrezanim spodnjim delom. Avtoklavirano brizgo smo razkužili s 96 % etanolom in jo zažgali, jo zapičili v sediment do oznake 1,5 ml, nato pa vzorec prenesli v 1,5 ml sterilno mikrocentrifugirko. Vzorce smo označili od 1 do 7 in jih shranili na ledu do prihoda v laboratorij, nato pa smo jih zamrznili na -20 °C do nadaljnje obdelave.



**Slika 3:** Prikaz odvzema vzorcev sedimenta Postojnske jame.

### 3.2 PROSTORSKA PORAZDELITEV VZORCEV

Med vsako vzorčevalno točko smo izmerili razdaljo in relativne višinske razlike v metrih. Nato smo izračunali matriko razdalj za ugotavljanje vzročnih povezav med posameznimi mesti vzorčenja med nadaljnjo obdelavo podatkov s programom CANOCO (Lepš in Šmilauer, 2003). Meritve so podane v **Prilogi A**.

### 3.3 PRIPRAVA VZORCEV ZA MERJENJE VSEBNOSTI CELOKUPNEGA OGLJIKA IN DUŠIKA

V sterilne mikrocentrifugirke smo zatehtali po 100 g vzorca. Vzorce smo posušili pri 50 °C (4105, Ehret Tkil, ZDA) preko noči in nato izmerili celokupni delež ogljika (C) in dušika (N) v skladu s standardom ISO 10694 (2010) po sežigu v analizatorju CN LECO CNS-2000 analyzer (LECO, ZDA)(Center za pedologijo, Univerza v Ljubljani). Določili smo tudi razmerje med C in N po enačbi:

$$\text{razmerje } C/N = \%C / \%N \quad \dots (1)$$

### 3.4 IZRAČUN GOSTOTE IN POROZNOSTI VZORCEV

Gostoto vzorcev smo izračunali po enačbi:

$$D_b = \frac{\text{teža suhega vzorca}}{\text{volumen sedimenta (trdni delci + pore)}} \quad \dots (2)$$

Volumen sedimenta ( $V$ ) smo izračunali iz podatkov premera brizge ( $2r$ ), s katero smo odvzeli vzorce in trikrat izmerjene dolžine valja ( $d$ ). Upoštevali smo aritmetično sredino treh meritev. Volumen smo izračunali po enačbi:

$$V = \pi \times r^2 \times d \quad \dots (3)$$

Za izračun poroznosti vzorcev smo najprej izračunali gostoto delcev po enačbi:

$$D_p = \frac{\text{teža suhega vzorca}}{\text{volumen trdnih delcev}} \quad \dots (4)$$

Kakšen je volumen trdnih delcev smo ugotovili tako, da smo v suh vzorec dodali znan volumen vode, nato pa smo od končnega volumna (voda in raztopljen vzorec) odšteli začetni volumen vode.

Poroznost smo izračunali po enačbi (Miller in Donaue, 1990):

$$\text{poroznost} = 1 - \frac{D_b}{D_p} \quad \dots (5)$$

### 3.5 UGOTAVLJANJE VELIKOSTI DELCEV IN TEKSTURE VZORCEV S PROGRAMOM ImageJ

Za določitev teksture vzorcev in velikosti delcev smo pripravili poltrajne mikroskopske preparate. V 1,5 ml destilirane vode smo raztopili 0,1 g vzorca nato pa vsak vzorec redčili

1000 x. Tako redčene vzorce smo premešali na vrtničnem mešalu (Vortex – genie 2, Scientific industri inc., ZDA) in takoj prenesli po 10 µl posameznega vzorca na nosilno steklice. Vzorec smo prekrili s krovnim steklcem in robove zatesnili z lakom za nohte.

Preparate smo pregledali pod epifluorescentnim mikroskopom BX50 F3 (Olympus, Japonska) pod 200 x povečavo in vsakega slikali po petkrat na različnih mestih.

Slike smo obdelali s programom ImageJ (Schmid in sod., 2010; Abramoff in sod., 2004) po navodilih Malneršič (2010) in tako določili povprečni premer delcev v posameznem vzorcu.

### 3.6 PRIPRAVA PREPARATOV ZA DIREKTNO ŠTETJE CELIC Z MIKROSKOPOM

Zatehtali smo 1 g vzorca, dodali 19 ml PBS pufra (Phosphate buffered saline) in steklene kroglice. Vse skupaj smo 30 min stresali pri 100 obratih/min (RVI-403, Tehnica Železniki, Slovenija) pri sobni temperaturi. Po stresanju smo odvzeli 9 ml suspenzije in ji dodali 1 ml 37 % formaldehida. Vzorec smo redčili 10 x in 100 x z destilirano vodo.

Filtra (Isopore<sup>TM</sup> membrane filters 0,2 µm GTBP, Millipore, ZDA) smo vpeli v okvirčka ter ju spirali s 5 ml 70 % etanola. Nato smo skozi prvi filter spustili 9 ml 10 x redčitve, skozi drugega pa 10 ml 100 x redčitve. Vzorca smo spirali s 500 µl propidijevega jodida (Sigma Aldrich; ZDA) in pustili stati 5 min. Filtra smo sprali z 1 ml PBS pufra in pustili stati 10 min, nato pa sprali še z dodatnih 5 ml PBS pufra.

Filtra smo previdno prenesli na objektno steklice in ju pokrili s krovnim steklcem. Robove smo zatesnili z lakom za nohte ter preparata pregledali z epifluorescentnim mikroskopom BX50 F3 pri 400 x povečavi pod UV svetlobo s filtrsko kocko z oznako WB.

Vzorci smo naknadno analizirali še z metodo barvanja celic z DAPI in FISH po protokolih institutov IMEDEA (Esporles) in Max – Planck (Bremen) v laboratorijih Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (IMEDEA – CSIC)(López-López in sod., 2010).

### 3.7 UGOTAVLJANJE HETEROGENOSTI DOLŽIN POMNOŽKOV REVERZNE RAKCIJE S POLIMERAZO

#### 3.7.1 Izolacija DNK s kompletom MoBio soil DNA extraction kit

Prvo serijo vzorcev za izolacijo DNK smo označili s črko A drugo pa s črko B. Vzorce smo odtalili, nato pa s sterilno spatulo odvzeli 0,5 g sedimenta. Sledila je izolacija DNK s kompletom MoBio soil DNA extraction kit (MO BIO Laboratories, Inc.; ZDA) po navodilih proizvajalca (MO BIO, 2009):

- zatehtan vzorec smo prenesli v priložen komplet in premešali na vrtničnem mešalu
- dodali smo 60 µl raztopine S1 in večkrat obrnili mikrocentrifugirko
- dodali smo 200 µl raztopine IRS in 10 min horizontalno mešali na vrtničnem mešalu
- vzorce smo centrifugirali 30 s pri 10.000 x g (Mini spin plus, Eppendorf, Nemčija)
- supernatant smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko in dodali 250 µl raztopine S2, premešali na vrtničnem mešalu in inkubirali 5 min pri 4 °C, nato pa zopet centrifugirali 1 min pri 10.000 x g
- 450 µl supernatanta smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko in dodali 900 µl raztopine S3 ter premešali na vrtničnem mešalu
- 700 µl raztopine smo prenesli na filter v čisto mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 min pri 10.000 x g, nato pa smo odstranili supernatant (postopek smo ponavljali dokler nismo sfiltrirali vse raztopine)
- na filter smo nato nanesti 300 µl raztopine S4 in centrifugirali 30 s pri 10.000 x g ter odstranili supernatant

- ponovno smo centrifugirali 1 min pri 10.000 x g in nato prenesli filter v novo čisto mikrocentrifugirko
- na sredino filtra smo nanесли 50 µl raztopine S5 in centrifugirali 30 s pri 10.000 x g
- filter smo odstranili. Tekočina, ki je ostala v mikrocentrifugirki, je bila izolirana skupna DNK, primerna za neposredno nadaljnjo uporabo. Vzorce smo shranili pri -20 °C.

Z enakim kompletom in postopkom smo izolirali tudi DNK iz pozitivne kontrole. Za pozitivno kontrolo smo vzeli vzorec krtine z bližnjega travnika.

Količino in kakovost izolirane DNK smo ugotavljali z gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu v 0,5 x TBE.

### **3.7.2 Pomnoževanje delov gena 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

Za pomnoževanje dela gena za 16S rRNK smo uporabili različico verižne reakcije s polimerazo in sicer LH PCR (length heterogeneity PCR). Metoda temelji na variaciji dolžin genov 16S rRNK, kar smo ugotavljali z dolžino fluorescentno označenih pomnožkov s kapilarno elektroforezo (ABI 3130X/Genetic Analyzer; Applied Biosystems; Carlsbad, ZDA). Z analizo smo ugotovili količino posameznega pomnožka točno določene dolžine. Slednji je odražal delež mikroorganizmov v mikrobnih združbi.

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200 µl mikrocentrifugirkah (Brand, Nemčija). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 1 x pufer z dodanim KCl (PCR buffer; Fermentas Life Sciences; ZDA), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov, 200 nM vsakega od začetnih oligonukleotidov (6FAM-27-f v 3' smeri kodirajoče verige in R534 v 5' smeri kodirajoče verige), 1 U/µl rekombinante polimeraze DNK iz *Thermus aquaticus* (TaqPol)(5 U/µl; Fermentas Life Sciences; ZDA), 1 µl matrične DNK in vodo (Sigma Aldrich; ZDA) do 25 µl.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu (MyCycler thermal cycler; BioRad Laboratories; Hercule; ZDA). Program PCR je prikazan v **Preglednici 2**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Količino in kakovost produkta smo ugotavljali z gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu v 0,5 x TBE.

**Preglednica 2:** Program LH PCR za pomnoževanje dela 16S rRNK.

Oznaka	T [°C]	t [min]	št.ciklov
Predcikel	95	5	1
Denaturacija	95	1	
Prileganje zač. olig.	52	1	30
Podaljševanje	72	1	
Podaljšana polim.	72	10	1
Vzdrževanje	4	∞	/

### 3.7.3 Čiščenje produktov PCR s kompletom High pure PCR product kit

Po končani reakciji PCR smo pozitivne vzorce očistili s kompletom High Pure PCR Product kit (Roche Diagnostics GmbH, Nemčija) po navodilih proizvajalca (Roche, 2008):

- 25 µl produkta PCR smo dodali 500 µl vezalnega pufra (Binding buffer) ter dobro premešali
- sestavili smo komplet in na filter prenesli raztopino iz prvega koraka
- sledilo je 30 s centrifugiranje pri 13.000 x g, nato pa smo odstranili supernatant
- na filter smo nanegli 500 µl spiralnega pufra (Wash Buffer) in centrifugirali 1 min pri 13.000 x g, nato pa odlili supernatant
- ponovili smo zgornji korak, le da smo dodamo samo 200 µl spiralnega pufra
- filter smo prenesli v novo čisto mikrocentrifugirko, dodali 50 µl elucijskega pufra (Elution Buffer) na sredino filtra in centrifugirali 1 min pri 13.000 x g



- filter smo zavrgli, čist produkt PCR, ki je ostal v mikrocentrifugirki pa smo shranili pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Dolžino pomnožkov PCR smo ugotovili s kapilarno elektroforezo. Prisotnosti pomnožkov smo preverili s programom Peak Scanner (Applied Biosystems, 2009), obdelali pa smo jih s programom Bionumerics (Applied Maths, 2010) po navodilih v skriptu BioNumerics Manual (Applied Maths, 2010).

### 3.8 KOLONIRANJE

#### 3.8.1 Priprava kompetentnih celic

Za pripravo kompetentnih celic smo pripravili 5 ml tekočega gojišča Luria Bertani (LB) z dodanim streptomycinom do končne koncentracije  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ . V tekoče gojišče smo nacepili  $50\text{ }\mu\text{l}$  bakterijske kulture *Echerichia coli* sev TOP10. Kulturo smo stresali v stresalniku pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri frekvenci 250 obratov/min preko noči ( $\sim 16\text{ h}$ ).

Naslednji dan smo prenesli  $0,5\text{ ml}$  zrasle kulture TOP10 v  $50\text{ ml}$  svežega tekočega LB gojišča in vse skupaj stresali v stresalniku pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri frekvenci 250 bratov/min dokler kultura ni dosegla absorbance  $0,35$  pri  $\text{OD}_{600}$  (cca.  $2\text{ h }40\text{ min}$ ).

Kulturo smo prenesli v dve predhodno ohlajeni  $50\text{ ml}$  falkonki in ju inkubirali  $10\text{ min}$  na ledu. Nato smo ju centrifugirali  $10\text{ min}$  pri  $2.700\text{ x g}$  pri temperaturi  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Falkonki smo prenesli na led za  $5\text{ min}$  nato pa odlili supernatant in s pipeto odstranili ostanke gojišča. Pelet smo  $5\text{ min}$  inkubirali na ledu, nato pa ga previdno resuspendirali v  $10\text{ ml}$  ledeno hladnega  $0,1\text{ M CaCl}_2$  in združili obe suspenziji v eno falkonko. Sledilo je  $10\text{ min}$  centrifugiranje pri  $2.700\text{ x g}$  pri temperaturi  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo takoj odlili in s pipeto odstranili ostanke  $\text{CaCl}_2$ . Pelet smo resuspendirali v  $2\text{ ml}$  raztopine glicerola v  $0,1\text{ M CaCl}_2$   $15\text{ }\%$  (v/v). Tako pripravljene kompetentne celice smo alikvotirali po  $100\text{ }\mu\text{l}$  v predhodno

ohlajene sterilne mikrocentrifugirke in jih hipno zamrznili v absolutnem etanolu ohlajenem na -70 °C. Kompetentne celice smo shranili pri -70 °C.

Genotip TOP10 F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr – hsdRMS - mcrBC) Φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara - leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

### 3.8.2 Priprava inserta z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200 μl mikrocentrifugirkah. Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 1 x PCR-pufer z dodanim KCl (Fermentas Life Sciences; ZDA), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov, 200 nM vsakega od začetnih oligonukleotidov (6FAM-27-f v 3' smeri kodirajoče verige in 927R v 5' smeri kodirajoče verige), 1 U/μl rekombinante DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (TaqPol) (5 U/μl; Fermentas Life Sciences; ZDA), 1 μl matrične DNK in Sigma vodo do 25 μl.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu MyCycler. Program PCR je prikazan v **Preglednici 3**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Količino in kakovost produkta smo ugotavljali z gelsko elektroforezo v 1 % agaroznem gelu v 0,5 x TBE. Točno količino DNK v vzorcih smo izmerili s spektrofotometrom Nanovue (GeneQuant<sup>TM</sup> 1300; Švedska).

**Preglednica 3:** Program PCR za pomnoževanje insertov za kloniranje.

Oznaka	T [°C]	t [min]	št.ciklov
Predcikel	95	5	1
Denaturacija	95	1	
Prileganje zač. olig.	52	1	30
Podaljševanje	72	1	
Podaljšana polim.	72	10	1
Vzdrževanje	4	∞	/

### 3.8.3 Čiščenje produkta PCR s kompletom Qiaquick Gel Extraction kit

15  $\mu$ l produkta PCR in 3  $\mu$ l nalagalnega pufru (Fermentas Life Sciences; ZDA) smo nanegli na 1 % agarozni gel v 0,5 x TBE ter izvedli gelsko elektroforezo. Nato smo gel slikali s kamero Gel Doc 1000 (Biorad; ZDA) in ga obdelali s programom Molecular Analyst Software (Biorad; ZDA). Iz gela smo izrezali mesta, kjer so bili na sliki pomnožki in jih prenesli v sterilne mikrocentrifugirke. Vsebino smo stehali in nato sčistili s kompletom Qiaquick Gel Extraction kit (QIAGEN; ZDA) po navodilih proizvajalca (QIAGEN, 2009):

- enemu volumnu izrezanega gela smo dodali tri volumne pufru QG (Buffer QG) (100 mg ~ 100  $\mu$ l)
- inkubirali smo ga pri 50 °C 10 min oz. dokler se gel ni popolnoma raztopil. Vmes smo vsebino večkrat premešali na vrtničnem mešalu
- sestavili smo komplet in raztopino prenesli na filter ter 1 min centrifugirali pri 13.000 obratih/min
- odstranili smo tekočino in dodali 0,5 ml pufru QG (Buffer QG); ponovno smo 1 min centrifugirali pri 13.000 obratih/min
- dodali smo 0,75 ml spiralnega pufru PE (Buffer PE) in pustili stati 5 min, nato smo 1 min centrifugirali pri 13.000 obratih/min
- odstranili smo tekočino in ponovili centrifugiranje
- filter smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko in na sredino filtra nanegli 50  $\mu$ l elucijskega pufru EB (Buffer EB); pustili smo stati 1 min, nato pa smo 1 min centrifugirali pri 13.000 obratih/min
- čisto DNK, ki je ostala v mikrocentrifugirki, smo shranili pri -20 °C

### 3.8.4 Kloniranje v vektor pJET 1.2

Najprej smo skoncentrirali čisto DNK iz gela v koncentradorju (Concentrator, Eppendorf, Nemčija) do 45 ng DNK v 7  $\mu$ l in tako zagotovili razmerje insert:vektor 3:1. Nato smo izvedli kloniranje s kompletom CloneJET PCR Cloning kit (Fermentas Life Sciences;

ZDA) po navodilih proizvajalca (Fermentas Life Sciences, 2010). V začetno reakcijo za pripravo ligacijske mešanice smo dali 7  $\mu$ l skoncentriranega produkta PCR in nič vode (Sigma Aldrich; ZDA).

- v mikrocentrifugirko smo odpipetirali 10  $\mu$ l 2 x reakcijskega pufra, 7  $\mu$ l produkta PCR in 1  $\mu$ l encima (DNA blunting enzyme)
- vse skupaj smo premešali na vrtničnem mešalu in inkubirali pri 70 °C za 5 min; po inkubaciji smo mešanico ohladili na ledu
- mešanici smo dodali 1  $\mu$ l vektorja pJET1.2 (pJET1.2/blunt cloning vector)(50 ng/ $\mu$ l) in 1  $\mu$ l T4 DNK ligaze (5 U/ $\mu$ l)
- vse skupaj smo premešali na vrtničnem mešalu in inkubirali pri 22 °C 30 min
- tako pripravljeno ligacijsko mešanico smo uporabili za transformacijo

### 3.8.5 Transformacija

Transformacijo smo izvedli s predhodno pripravljenimi kompetentnimi celicami *E.coli* sev TOP10.

Za transformacijo smo porabili 100  $\mu$ l kompetentnih celic TOP10, ki smo jih odtalili na ledu. Z ohlajenimi nastavki za avtomatsko pipeto smo dodali 10  $\mu$ l ligacijske mešanice (vektor pJET1.2 z inserti) in vse skupaj nežno premešali z obračanjem. Sledila je 30 minutna inkubacija na ledu. Nato smo mešanico prenesli v termoblok (Agilent Technologies; ZDA) na 42 °C za 90 s. Sledila je 3 minutna inkubacija na ledu. Nato smo dodali 400  $\mu$ l predhodno ogretega tekočega gojišča LB na 37 °C in mešanico stresali 60 minut pri 150 obratov/min na 37 °C. Transformante smo razmazali na predhodno ogrete petrijevke z gojiščem LB Amp na 37 °C. Nanesli smo 2 x 100  $\mu$ l, 4 x 50  $\mu$ l in 5 x 20  $\mu$ l mešanice. Petrijevke smo inkubirali pri 37 °C za ~ 16 ur. Plošče smo nato shranili pri 4 °C.

### 3.8.6 Pikiranje

Sterilne mikrotitrne plošče (Educell d.o.o.; Slovenija) smo napolnili z gojiščem LB freezing buffer (150  $\mu$ l/jamico) z dodanim Amp, nato pa v posamezno jamico prepikirali po eno transformanto zraslo na petrijevki z gojiščem LB Amp. Mikrotitrne plošče smo nato stresali pri 100 obratih/min pri 30 °C preko noči.

### 3.8.7 Pomnoževanje insertov vključenih v vektor pJET 1.2 z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) – colony PCR

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200  $\mu$ l. Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 1 x PCR-pufer z dodanim KCl (Fermentas Life Sciences; ZDA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov, 200 nM vsakega od začetnih oligonukleotidov ("pJET1.2 forward sequencing primer" v 3' smeri kodirajoče verige in "pJET1.2 reverse sequencing primer" v 5' smeri kodirajoče verige), 0,5 U/ $\mu$ l rekombinante DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (TaqPol) (5 U/ $\mu$ l; Fermentas Life Sciences; ZDA), 1  $\mu$ l suspenzije zraslih transformant in Sigma vodo do 20  $\mu$ l.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu MyCycler. Program PCR je prikazan v **Preglednici 4**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Kakovost in količino produkta smo ugotavljali z gelsko elektroforezo v 1,5 % agaroznem gelu v 0,5 x TBE.

**Preglednica 4:** Program PCR za preverjanje velikosti insertov vključenih v vektor pJET1.2.

Oznaka	T [°C]	t [min]	št.ciklov
Predcikel	95	10	1
Denaturacija	95	1	
Prileganje zač. olig.	55	1	25
Podaljševanje	72	1	
Podaljšana polim.	72	10	1
Vzdrževanje	4	∞	/

### 3.8.8 Začetni oligonukleotidi

**Preglednica 5:** Začetni oligonukleotidi.

Oznaka	Zaporedje	Tm	Vir
6FAM-27f	5'- AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3' označen s 6-FAM (6- carboxyfluorescein) na 5' koncu	57,3 °C	Weisburg in sod.,1991
927R	5'- CCGTCAATTCCTTT RAGTTT-3'	57 °C	Lane, 1991
R534	5- ATTACCGCGGCTGC TGGC -3'	60 °C	Casserly in Erijman, 2003
pJET1.2 F, 23-mer	5'- d(CGACTCACTATA GGGAGAGCGGC)-3'	74 °C	Fermentas Life Sciences, 2010
pJET1.2 R, 24-mer	5'- d(AAGAACATCGAT TTCCATGGCAG)-3'	68 °C	Fermentas Life Sciences, 2010

### 3.9 OBDELAVA IN PRIMERJAVA SEKVENC 16S rRНК

Dobljene sekvence smo vnesli in obdelali s programom CodonCode Aligner (2002), s katerimi smo odstranili sekvence vektorja, določili kvalitetne dele sekvenc ter jih shranili v tekstovno datoteko. Tako obdelane sekvence smo pregledali na strani Greengenes (Greengenes, 2010) z orodji za poravnavo sekvenc 16S rRНК (DeSantis in sod., 2006b) ter iskanje kimer (DeSantis in sod., 2006a). Sekvence brez kimer smo na strani RDP II (2010) analizirali z orodjem Classifier (Wang in sod., 2007), klonske knjižnice pa smo med seboj primerjali z orodjem Libcompare (Cole in sod., 2009). Vse tri knjižnice smo tudi primerjali z drugimi znanimi knjižnicami jam in specifičnih okolij (**Priloga C**), ki smo jih pridobili na strani NCBI (2009). Za primerjavo smo uporabili program PAST (Hammer in sod., 2001), uporabljena mera za oddaljenost pa je bila indeks Bray-Curtis.

### 3.10 MIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJSKIH ZDRUŽB - INKORPORACIJA RADIOAKTIVNO OZNAČENEGA LEUCINA

Vzorci jamskega sedimenta, negativno kontrolo (avtoklavirana destilirana voda) in pozitivno kontrolo (krtina) smo pripravili po protokolu, ki so ga opisali Bååth in sodelavci (2001) z nekaj modifikacijami.

V 50 ml falkonko smo zatehtali do 3 g vzorca in ga raztopili v 40 ml miliQ vode. Vsebino smo stresali 5 ur na stresalniku (130 obratov/min) pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato prenesli v centrifugo (Beckman coulter Allegra™ X-12R centrifuge, Novo analitica) in jih 5 min centrifugirali pri nizkih obratih (1000 x g/min). Supernatant vsakega vzorca smo prenesli v 12 mikrocentrifugirk z navojem (Brand; Nemčija) po 1,5 ml in jih shranili pri 4 °C.

S centrifugalno metodo, ki smo jo izvedli v laboratorijih Morske biološke postaje Piran, smo v vzorce vnesli radioaktivno označen leucin. Bakterijski suspenziji (1,5 ml) smo dodali 3,75 µl L- [U<sup>14</sup>C]leucina in vzorce 24 ur inkubirali pri temperaturi 12 °C. Nato smo

dodali 75 µl ledeno hladne 100 % trikloroocetne kisline (TCA), premešali na vrtničnem mešalu in 30 minut inkubirali pri 5 °C. Kontrolnim vzorcem smo dodali TCA pred vnosom radioaktivnega leucina in jih shranili pri 5 °C. Sledilo je spiranje vzorcev. Vzorce smo 10 min centrifugirali pri 13.000 obratih/min in odstranili supernatant. Peletu smo dodali 1,5 ml hladne 5 % TCA, centrifugirali in spet odstranili supernatant. V zadnjem spiralnem koraku smo dodali 1,5 ml ledeno hladnega 80 % etanola, centrifugirali in odstranili supernatant. Dodali smo 0,2 ml 1 M NaOH, vzorce premešali na vrtničnem mešalu in jih 60 min inkubirali pri 90 °C. Nato smo vzorce ohladili, jim dodali 1 ml scintilatorskega koktajla (Bååth in sod., 2001) ter v tekočinskem scintilatorju (TR2500; Packard; ZDA) izmerili radioaktivnost vzorcev.

Rezultate smo prikazali na grafu, kjer x os predstavlja vzorec, y os pa povprečne vrednosti razpadov na minuto - DPM (disintegration per minute).

### 3.11 IZRAČUN DELEŽA VARIABILNOSTI IN AKTIVNOSTI BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH PARAMETROV

Za ugotavljanje deleža variabilnosti bakterijske združbe in aktivnosti smo pripravili štiri tabele, ki so zajemale podatke o okoljskih parametrih, prostorskih parametrih, aktivnosti in sestavi bakterijske združbe. Za tabelo aktivnosti, prostorskih parametrov ter sestavo bakterijske združbe smo izračunali matriko razdalj, ki smo jo pretvorili v koordinate ordinacije NM-MDS (non metric multidimensional scaling). Koordinatam prostorskih parametrov smo dodali vrednosti polinoma tretje stopnje in podatke skupaj z okoljskimi parametri obdelali s programom CANOCO (Lepš in Šmilauer, 2003). Ugotavljali smo delež variabilnosti v sestavi mikrobne združbe, ki jo razložijo samo okoljski parametri, samo prostorska razporeditev in kovariabilnost med obema skupinama, ter enak postopek ponovili še za ugotavljanje deleža variabilnosti v aktivnosti. Ugotavljali smo, kateri izmed parametrov razložijo opažene vzorce v sestavi in aktivnosti jamskih mikrobnih združb. Zaradi omejitve odvzema vzorca 3 (Vermikuliti) vseh meritev na tem vzorcu nismo mogli opraviti. Podatkov za ta vzorec zato nismo uporabili v nadaljnjih izračunih.



### 3.12 GOJIŠČA, PUFRI, RAZTOPINE

#### 3.12.1 Gojišče Luria Bertani (LB) z ampicilinom (Amp)

Trdno gojišče LB Amp smo pripravili po sledeči recepturi:

	<u>za 1000 ml</u>
Tripton	10 g
Kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	5 g

Vse sestavine smo raztopili v 800 ml destilirane vode in umerili pH na 7,0 s pH metrom (520A; Orion; ZDA). Nato smo dodali destilirano vodo do 1000 ml in 15 g agarja ter vse skupaj dobro premešali ter avtoklavirali v avtoklavu (A-21CA; Kambič laboratorijska oprema; Slovenija).

Sterilno gojišče smo ohladili na 50 °C in dodali 1 ml Amp (100 mg/ml) do končne koncentracije 100 µg/ml. Gojišče smo razlili v sterilne petrijevke in počakali, da se je strdilo. Petrijevke smo ustrezno označili in jih shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

#### 3.12.2 Pufer Luria Bertani za zamrzovanje sevov z dodanim ampicilinom (LB freezing buffer Amp)

Pufer smo pripravili po sledeči recepturi:

		<u>za 100 ml</u>
36 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63 g
13,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,18 g
1,7 mM	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,05 g
0,4 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,11 g
6,8 mM	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,09 g

4,4 %	glicerol	4,4 ml
	LB tekoče gojišče	100 ml

Soli smo raztopili v 100 ml LB tekočega gojišča, vse dobro premešali in odmerili 95,6 ml raztopine v novo stekleničko. Dodali smo 4,4 ml 100 % glicerola in vse skupaj dobro premešali. Tako pripravljeno gojišče smo avtoklavirali v avtoklavu (2100 Classic; Prestige medical; Anglija).

Sterilno gojišče smo ohladili na 50 °C in mu dodali 100 µl Amp (100 mg/ml) do končne koncentracije 100 µg/ml ter ga shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

### 3.12.3 Pufer PBS (Phosphate buffered saline)

Pufer smo pripravili po sledeči recepturi:

		<u>za 500 ml</u>
0,13 M	NaCl	3,8 g
7 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,625 g
3 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,235 g

Soli smo raztopili v 500 ml destilirane vode in umerili pH na 7,2 s pH metrom ter raztopino avtoklavirali v avtoklavu 2100 Classic. Pufer smo shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

### 3.12.4 Gelska elektroforeza

Za gelsko elektroforezo smo pripravili 0,5 x pufer TBE tako, da smo v 900 ml destilirane vode zamešali predhodno pripravljen 5 x TBE.

Receptura za pripravo 5 x pufra TBE (Tris-borat-EDTA):

	<u>za 1000 ml</u>
EDTA	20 ml
Tris baza	54 g
Borova kislina	27,5 g
dH <sub>2</sub> O	980 ml

Gele smo pripravili po sledeči recepturi:

**Preglednica 6:** Sestava agaroznega gela.

<b>1 % gel</b>	<b>40 ml</b>	<b>50 ml</b>	<b>100 ml</b>
Agaroz	0,4 g	0,5 g	1 g
0,5 x TBE	40 ml	50 ml	100 ml
<b>1,5 % gel</b>	<b>40 ml</b>	<b>50 ml</b>	<b>100 ml</b>
Agaroz	/	/	1,5 g
0,5 x TBE	/	/	100 ml

## 4 REZULTATI

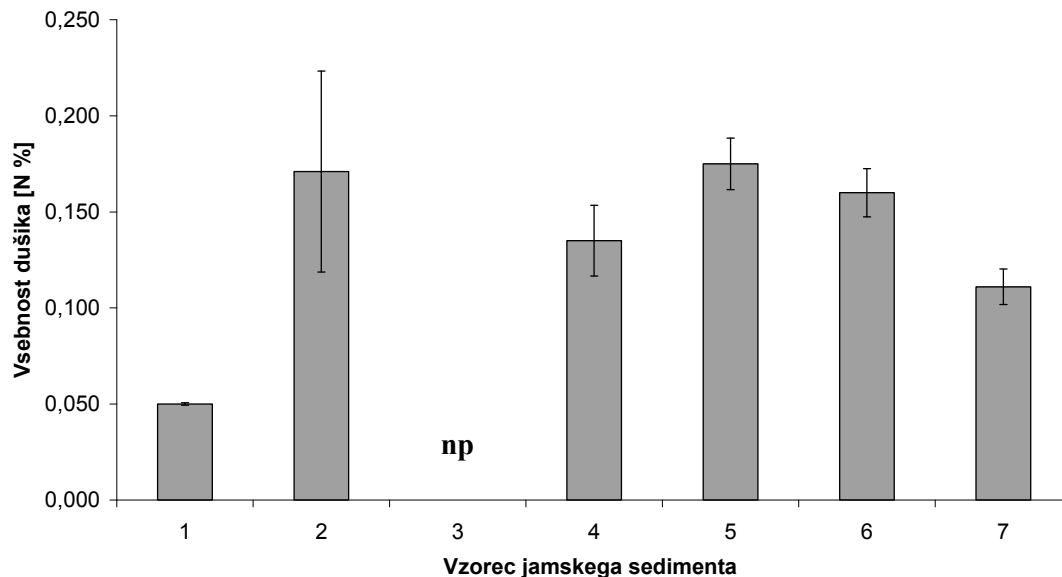
### 4.1 DELEŽ CELOKUPNEGA DUŠIKA (N) IN OGLJIKA (C)

Deležev C, N in razmerja C/N nismo določili v vzorcu 3 zaradi premajhne količine vzorca. V **Preglednici 7** so podane vrednosti deležev in razmerij C/N. **Sliki 4** in **5** prikazujeta povprečne deleže C in N, **Slika 6** pa razmerje med njima v posameznem vzorcu.

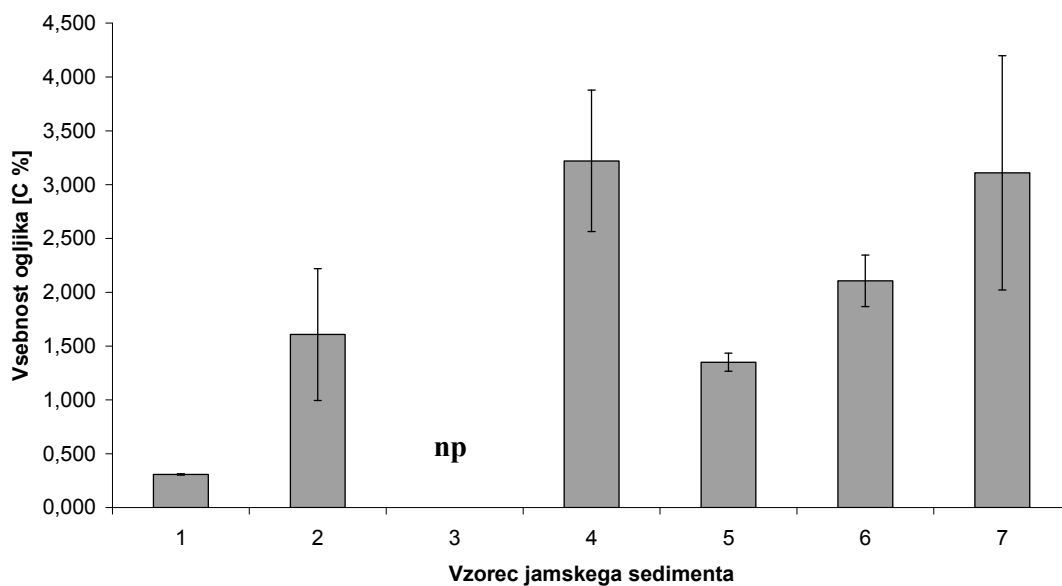
**Preglednica 7:** Deleži ogljika in dušika ter izračunana razmerja C/N v sedimentih Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljeno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljene struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljeno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

	N [%]	SD N [%]	C [%]	SD C [%]	C/N	SD C/N
vzorec 1	0,050	0,001	0,307	0,006	6,14	0,13
vzorec 2	0,171	0,052	1,607	0,612	9,40	0,92
vzorec 3	*np	np	np	np	np	np
vzorec 4	0,135	0,018	3,220	0,657	23,85	1,63
vzorec 5	0,175	0,013	1,350	0,084	7,71	0,16
vzorec 6	0,160	0,012	2,106	0,239	13,16	0,84
vzorec 7	0,111	0,009	3,109	1,088	28,01	11,58

\*np – ni podatka

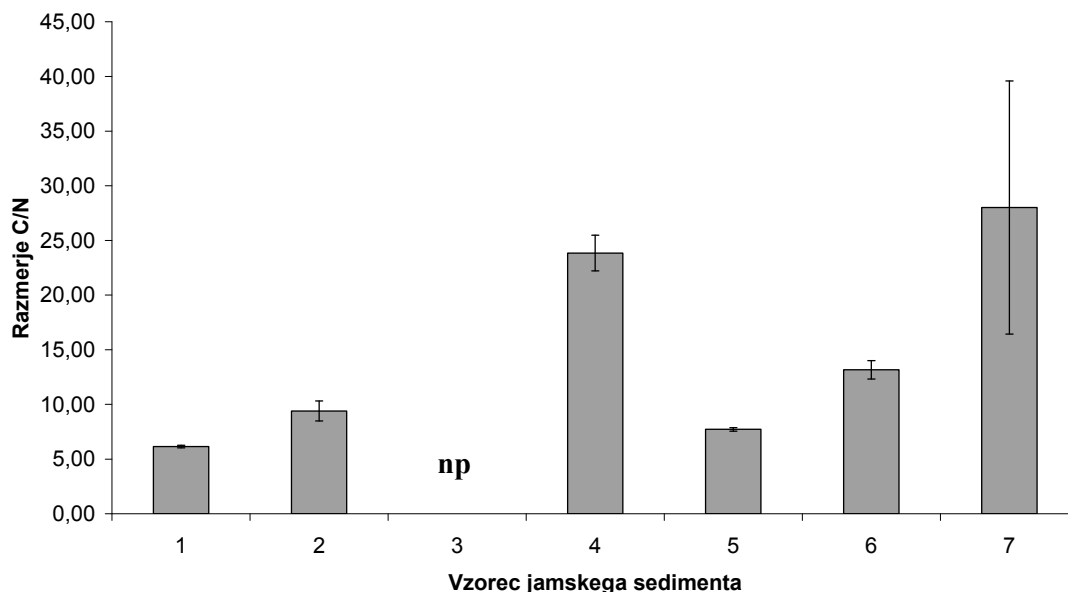


**Slika 4:** Delež dušika v sedimentih Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljeno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljene struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljeno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.



**Slika 5:** Delež ogljika v sedimentih Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljeno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljene struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljeno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

Iz obeh grafov je razvidno, da je bila vsebnost N in C v vzorcih primerljiva, najnižja pa je bila v najstarejšem vzorcu. Variabilnost drugega najstarejšega vzorca in ostalih kaže na prostorsko raznolikost porazdelitve vsebnosti N in C.



**Slika 6:** Razmerja C/N v sedimentih Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljenno območje), 6 – sediment z dna občasnopoplavljene struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljenno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

Največje razmerje C/N je bilo v vzorcu 7 (28,01) najmanjše pa v vzorcu 1 (6,14). Izstopal je tudi vzorec 4 z razmerjem 23,85. Glede na standardne deviacije je bilo najbolj natančno določeno razmerje v vzorcu 1 in 5, najmanj pa v vzorcu 7.

#### 4.2 GOSTOTA VZORCEV IN POROZNOST

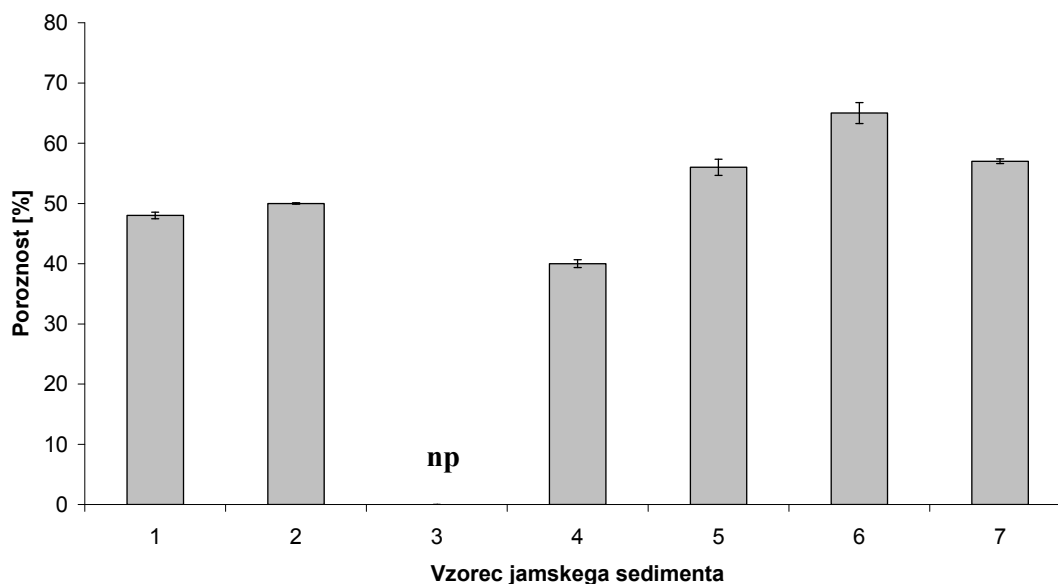
Gostoto vzorcev smo izračunali po enačbi ... (2), poroznost pa po enačbi ... (5) (glej poglavje Materiali in metode). Pri gostoti vzorcev smo upoštevali volumen trdnih delcev in por, za izračun poroznosti pa smo izračunali še gostoto delcev brez por po enačbi ... (4) (glej poglavje Materiali in metode), nato pa izračunali razmerje med gostoto vzorcev in

gostoto delcev. V **Preglednici 8** so prikazani deleži poroznosti in gostota vzorcev. **Sliki 7** in **8** prikazujeta izračunan delež por in izračunano gostoto posameznih vzorcev. Podatki za vzorec 3 manjkajo zaradi premajhne količine vzorca.

**Preglednica 8:** Deleži poroznosti in gostota sedimentov Postojnske jame. Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

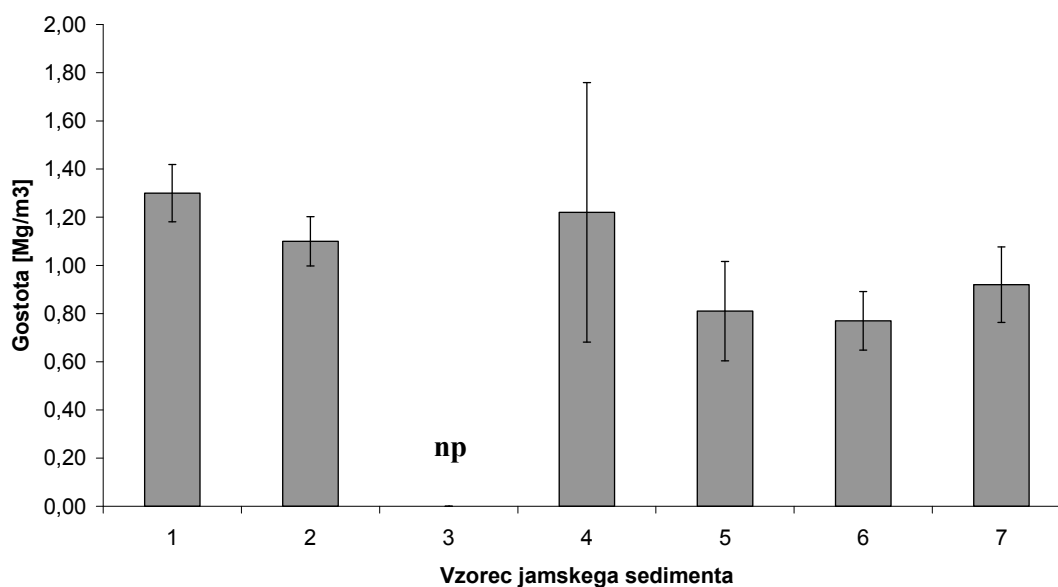
	<b>Poroznost [%]</b>	<b>SD poroznost [%]</b>	<b>Gostota [Mg/m<sup>3</sup>]</b>	<b>SD gostote [Mg/m<sup>3</sup>]</b>
vzorec 1	48	0,55	1,30	0,12
vzorec 2	50	0,13	1,10	0,10
vzorec 3	*np	np	np	np
vzorec 4	40	0,66	1,22	0,54
vzorec 5	56	1,33	0,81	0,21
vzorec 6	65	1,74	0,77	0,12
vzorec 7	57	0,39	0,92	0,16

\*np – ni podatka



**Slika 7:** Poroznost sedimentov v Postojnski jami. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljeno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljenega struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljeno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

Delež por v vzorcih je bil med 40 % in 65 %. Najstarejša vzorca sta imela zelo primerljivo poroznost. Najbolj porozen je bil vzorec 6, najmanj pa vzorec 4.



**Slika 8:** Gostota sedimentov Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljenno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljenne struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljenno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

Gostota vzorcev je bila med  $0,77 \text{ Mg/m}^3$  in  $1,30 \text{ Mg/m}^3$ . Vzorci 1, 2 in 4 so bili v rangju gostote, ki ustreza mineralnim prstem ( $1,00 - 1,80 \text{ Mg/m}^3$ ). Najbolj gost je bil vzorec 1, najmanj pa vzorec 6. Glede na standardno deviacijo je bila najbolj natančno določena gostota v vzorcu 2, najmanj pa v vzorcu 4.

#### 4.3 VELIKOST DELCEV IN TEKSTURA VZORCEV

S programom ImageJ (Schmid in sod., 2010; Abramoff in sod., 2004) smo po navodilih, ki jih je v diplomskem delu opisal Malneršič (2010), izmerili premer delcev v vseh sedmih vzorcih jamskega sedimenta. Povprečni premer v vseh vzorcih je bil  $\sim 0,01 \text{ mm}$ . Po mednarodni teksturni klasifikaciji smo jih uvrstili v skupino melja ( $0,02 - 0,002 \text{ mm}$ ).



#### 4.4 DOLOČITEV KONCENTRACIJE BAKTERIJ V VZORCIH JAMSKIH SEDIMENTOV

Za štetje celic pod mikroskopom smo pripravili poltrajni mikroskopski preparat barvan s propidijevim jodidom. Odločili smo se, da bomo začetno koncentracijo določali le v vzorcu 2, saj nas je zanimalo, koliko bakterij je v tako starem sedimentu (~ 20.000 let). Po pregledu preparata pod mikroskopom Olympus BX50 F3 smo prepoznali posamezne bakterijske celice vendar je bilo njihovo število na vidno polje premajhno za določitev koncentracije bakterij v vzorcu.

Zato smo se odločili, da isti vzorec barvamo še z DAPI in po FISH z optimizacijo protokolov institutov IMEDEA in Max-Planck (López-López in sod., 2010). Število vidnih celic po barvanju z DAPI in po FISH je bilo po opravljenih analizah manjše od  $10^4$  na gram sedimenta. Bolj natančna števila celic v preiskanem vzorcu sedimenta nismo mogli določiti.

Za tako majhno število celic v vzorcih jamskih sedimentov obstaja več razlag. Prva je resnično majhno število celic v samem sedimentu, druga močna trdnost povezav med celicami in delci sedimentov, zaradi česar je težko pripraviti homogeno suspenzijo celic za štetje, tretja pa je neenakomerna porazdelitev bakterij v jamskih sedimentih.

#### 4.5 PRIMERJAVA SESTAVE MIKROBNIH ZDRUŽB V SEDIMENTIH POSTOJNSKE JAME Z METODO LH PCR

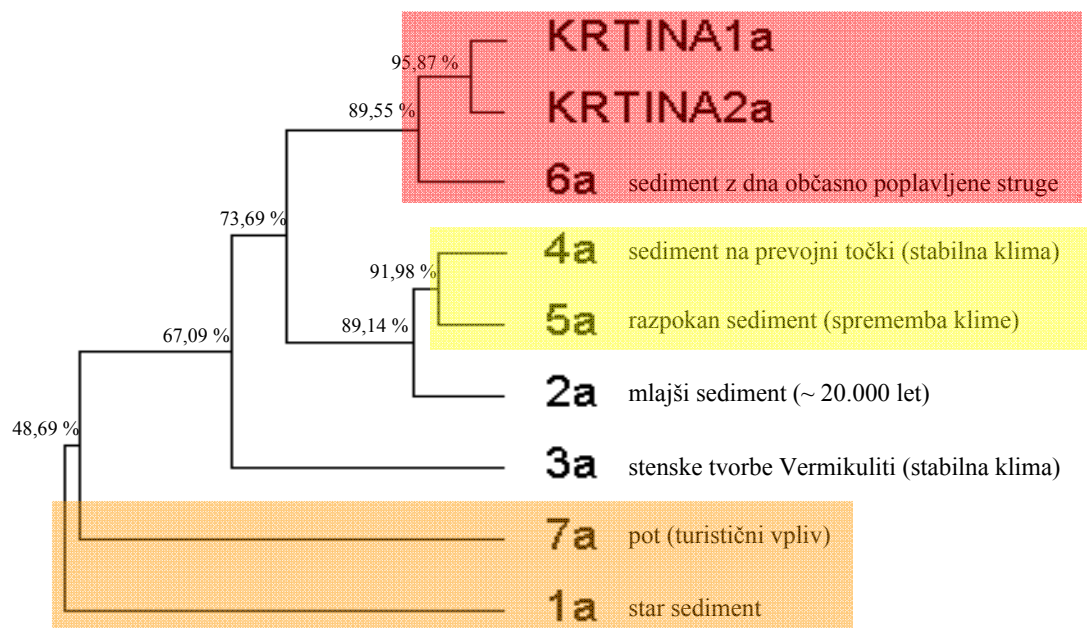
Dendrograma, ki prikazujeta podobnost sestave bakterijske mikrobne združbe v različnih vzorcih, smo izračunali s programom BioNumerics (Applied Maths, 2010). **Sliki 9 in 10** prikazujeta primerjavo po podobnosti dveh serij vzorcev.

Iz dendrogramov je razvidno, da so posamezni vzorci tvorili gruče in da so se vejale podobno v obeh vzporedno primerjanih serijah vzorcev z dvema izjemama. Edina vzorca,

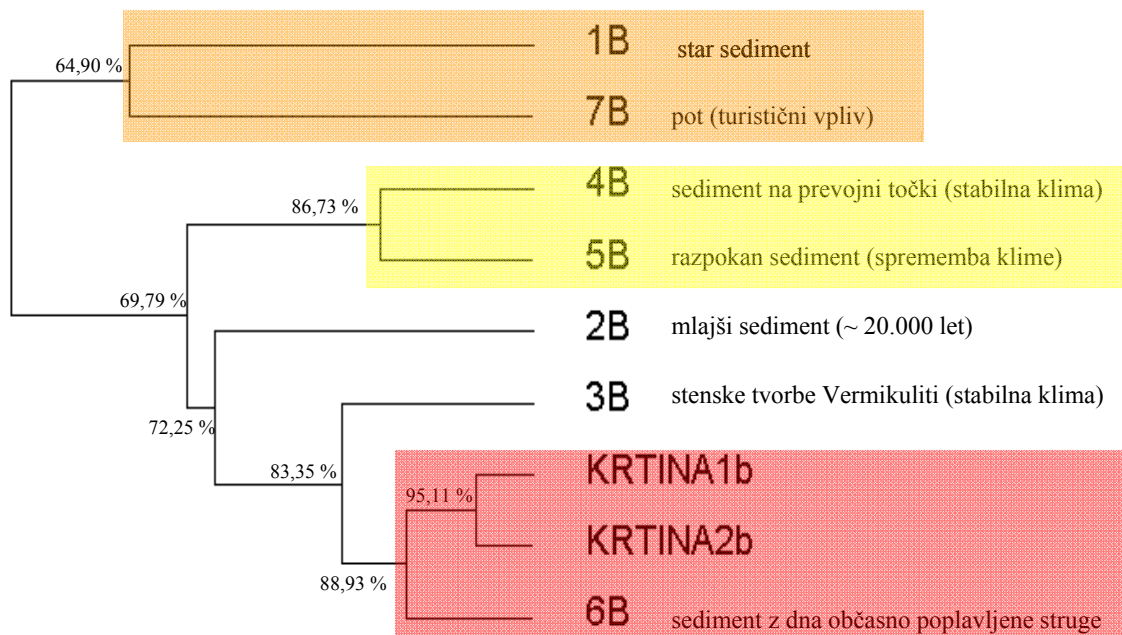
katerih podobnost se je med serijama razlikovala, sta vzorca 2 (mlajši sediment ~20.000 let) in 3 (stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima)). Razlog za to bi lahko bila prostorska raznolikost v teh dveh vzorcih.

Posebno pozornost si zasluži skupno vejanje vzorca 6 (sediment z dna občasno poplavljenega struge) z obema vzorcema odvzetima z vrha sveže krtine. Krtine vsebujejo zemljo izpod nivoja korenin, zaradi česar ne vsebujejo bogatih rizosfernih mikrobnih združb ter lahko dostopnih virov ogljika (eksudati in rastlinski ostanki). Skupno vejanje kaže na veliko podobnost sestave mikrobnih združb v meljasti in pogosto poplavljeni strugi ter peščenih tleh brez rastlinskih ostankov krtine.

Gruča sedimentov 4 (sediment na prevojni točki (stabilna klima)) in 5 (razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljeno območje)) je glede na okoljske dejavnike ravno tako presenetljiv, saj kaže, da je vloga 3-letnih poplav majhna, oziroma, da so v preteklosti morda poplave segale višje.



**Slika 9:** Dendrogram podobnosti sestave mikrobnih združb serije A izrisan s programom Bionumerics (Applied Maths, 2010).



**Slika 10:** Dendrogram podobnosti sestave mikrobnih združb serije B izrisan s programom Bionumerics (Applied Maths, 2010).

#### 4.6 TAKSONOMSKA UVRSTITEV SEKVENC IN PRIMERJAVE KLONSKIH KNJIŽNIC

Pripravili smo tri klonske knjižnice. Odločili smo se za vzorce 2, 3 in 4. Vzorec 2 smo izbrali zaradi starosti sedimenta ~ 20.000 let, vzorec 3 zaradi posebnosti stenskih tvorbo Vermikulitov, vzorec 4 pa zato, ker je predstavljal klasičen jamski sediment s stabilno jamsko klimo.

Po odstranitvi sekvenc vektorja in določitvi kvalitetnih delov sekvenc s programom CodonCode Aligner (2002) smo na strani Greengenes (2010) z orodji Align (DeSantis in sod., 2006b) in Chimera Check (DeSantis in sod., 2006a) preverili prisotnost kimerne sekvenc. Našli smo 3 kimerne sekvence, vse iz klonske knjižnice stenskih tvorbo Vermikulitov. Predvidene kimere so bile sekvence Vermikuliti G12, H11 in F5, ki smo jih

iz nadaljnjih analiz umaknili. Na koncu smo pridobili 285 kvalitetnih sekvenc za taksonomsko uvrstitev in primerjavo.

Klonske knjižnice smo med seboj primerjali s programom Libcompare (Cole in sod., 2009) v podatkovni bazi RDP II (2010). Deleži bakterijskih debel, zastopanih v posamezni knjižnici, so prikazani v **Preglednici 9**. Grafični prikaz zastopanosti posameznih debel pa je predstavljen v **Prilogi B**.

**Preglednica 9:** Deleži posameznih bakterijskih skupin zastopanih v knjižnicah sedimenta starega ~20.000 let, stenskih tvorb Vermikulitov in sedimenta na prevojni točki.

<b>Bakterijsko deblo</b>	<b>Sediment star ~ 20.000 let [%]</b>	<b>Sediment s prevojne točke [%]</b>	<b>Stenske tvorbe Vermikuliti [%]</b>
<i>Actinobacteria</i>	0,0	7,3	9,7
<i>Verrucomicrobia</i>	0,0	1,0	0,0
<b>OD1</b>	1,0	0,0	1,1
<i>Planctomycetes</i>	1,0	2,1	1,1
<i>Chloroflexi</i>	0,0	2,1	1,1
<i>Firmicutes</i>	0,0	2,1	1,1
<i>Acidobacteria</i>	8,3	2,1	16,1
<i>Bacteroidetes</i>	0,0	2,1	1,1
<i>Gemmatimonadetes</i>	3,1	0,0	0,0
<i>Proteobacteria</i>	59,4	24,0	35,5
<i>Nitrospira</i>	0,0	0,0	2,2
<b>neuvrščene bakterije</b>	22,9	42,7	25,8
<b>neznani organizmi</b>	3,7	14,6	5,4

Klonska knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let je bila najmanj raznolika, saj v primerljivo velikih vzorcih mikrobnih združb nismo zaznali predstavnikov kar šestih debel, ki v knjižnicah prevojne točke in Vermikulitov predstavljajo 14,6 % in 15,2 % vseh klonov. Knjižnici sedimenta prevojne točke in stenskih tvorb Vermikulitov sta si bili po sestavi in bakterijski raznolikosti precej podobni.

V vseh treh knjižnicah se je pojavil velik delež sekvenc, ki pripada neuvrščenim bakterijam. V primeru knjižnice sedimenta s prevojne točke je bil delež neuvrščenih bakterij največji, kar 42,7 %, med tem ko je bil v knjižnicah sedimenta starega ~ 20.000 let

in stenskih tvorb Vermikulitov le ta nižji (22,9 % in 25,8 %). Manjši delež je pripadal tudi sekvencam neznanih organizmov (sediment s prevojne točke 14,6 %, sediment star ~ 20.000 let 3,7 %, stenske tvorbe Vermikuliti 5,4 %). Knjižnico sedimenta starega ~ 20.000 let je sestavljalo le pet znanih bakterijskih debel, vsebovala pa je najnižji delež neuvrščenih bakterij in neznanih organizmov. Knjižnici sedimenta prevojne točke in stenskih tvorb Vermikulitov pa sta si bili po sestavi precej podobni. Prvo je sestavljalo osem znanih bakterijskih debel, največji delež neuvrščenih bakterij in neznanih organizmov, drugo pa devet znanih bakterijskih debel ter primerljiv delež neuvrščenih bakterij in neznanih organizmov kot v primeru knjižnice sedimenta starega ~ 20.000 let.

V vseh treh primerih se je kot dominantno deblo pojavilo okoljsko najbolj razširjeno deblo *Proteobacteria*. V knjižnicah sedimenta starega ~ 20.000 let in prevojne točke je največ sekvenc pripadalo poddeblu *Gammaproteobacteria* (53,1 % in 14,6 %), ki so bile v nižjem deležu (6,5 %) prisotne tudi v knjižnici stenskih tvorb Vermikulitov. V vseh treh knjižnicah smo ugotovili tudi poddebli *Alphaproteobacteria* in *Betaproteobacteria*. Obe poddebli sta bili dominantni v primeru stenskih tvorb Vermikulitov (predstavljali sta po 14 %). Slednja knjižnica je izstopala tudi zaradi zastopanosti neuvrščenih predstavnikov poddebla *Deltaproteobacteria* (1,1 %), knjižnici sedimenta starega ~ 20.000 let in prevojne točke pa sta izstopali z manjšim deležem neuvrščenih predstavnikov iz debla *Proteobacteria* (1 % in 2,1 %).

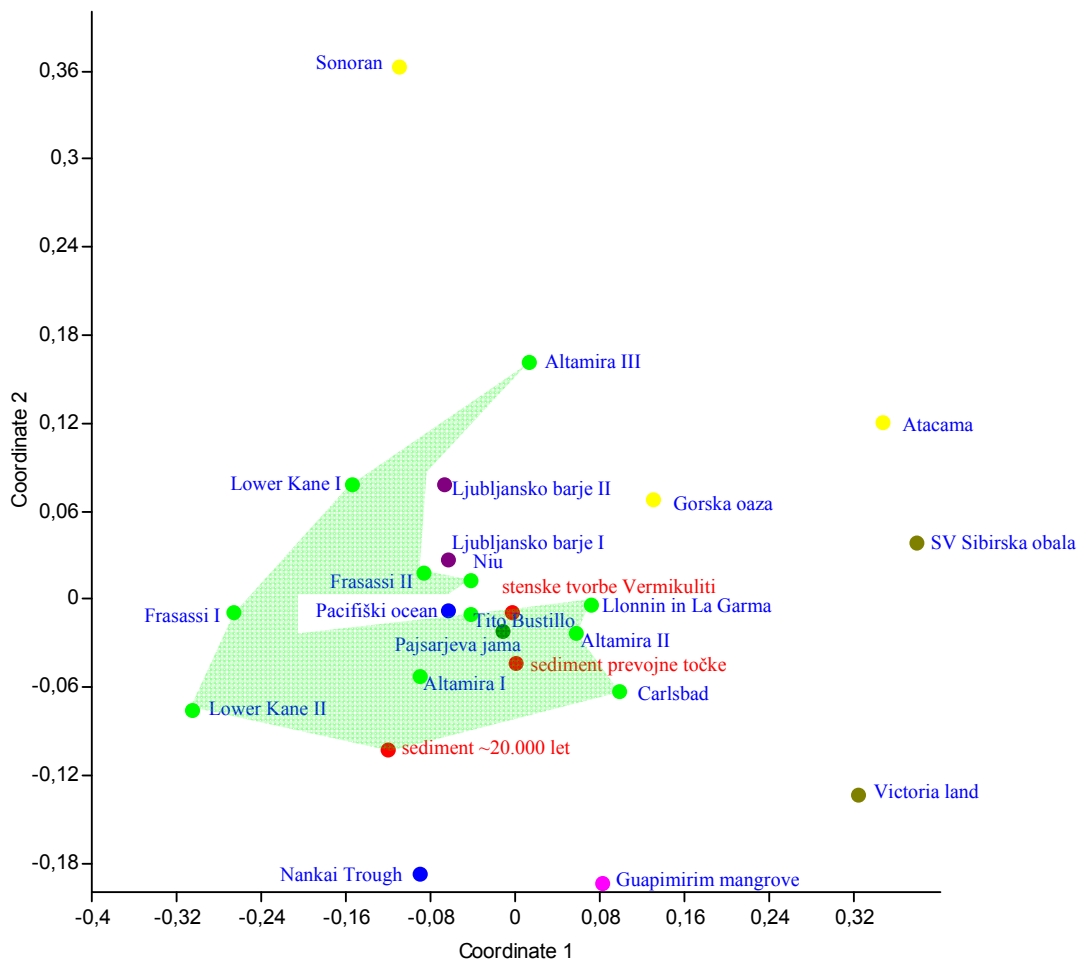
Bakterijska debla, ki so se pojavila le pri posamezni klonski knjižnici, so bila *Verrucomicrobia* (1 %) v primeru sedimenta prevojne točke, *Gemmatimonadetes* (3,1 %) v primeru sedimenta starega ~ 20.000 let in *Nitrospira* (2,2 %) v primeru stenskih tvorb Vermikulitov.

Zanimiva je prisotnost bakterijskega debla *Gemmatimonadetes*, saj je poznana ena sama gojena vrsta *Gemmatimonas aurantiaca* izolirana iz aktivnega blata. Kljub temu, da poznamo le eno gojeno vrsto, okoljske sekvence kažejo na to, da je deblo močno razširjeno v naravi in je filogenetsko bolj raznoliko kot dobro poznano deblo *Actinobacteria* (Zhang in sod., 2003). Poleg tega so predstavnike debla *Gemmatimonadetes* našli tudi v jami Niu

provinc Guizhou na Kitajskem, kjer so predstavljali 2,7 % mikrobne združbe v vzorcu jamskega sedimenta (Zhou in sod., 2007).

V deblu *Actinobacteria* bi lahko bili prisotni predstavniki vrst z zmožnostjo produkcije različnih antibiotikov ter drugih fermentativnih stranskih produktov, bakterijsko deblo *Planctomycetes* pa bi lahko vsebovalo posamezne predstavnike, ki so zmožni vršiti poseben anaeroben proces odstranitve amoniaka, imenovan anamoks.

Sekvence iz vseh treh knjižnic ter iz javno dostopnih klonskih knjižnic jam in drugih okolij (**Priloga C**) smo taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier (Wang in sod., 2007). S programom PAST (Hammer in sod., 2001) smo prikazali njihove medsebojne odnose. Knjižnici sedimenta jamskih tal in stenskih tvorb Vermikulitov sta si bili podobni in sta se uvrščali blizu knjižnice jamskih stenskih tvorb iz Pajsarjeve jame (Pašić in sod., 2009), španske jame Tito Bustillo (Schabereiter Gurtner in sod., 2002b) ter drugih. Knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let je izstopala in je bila precej oddaljena od ostalih primerjanih knjižnic jam. Še najbližja je bila knjižnica iz španske jame Altamira I (Schabereiter Gurtner in sod., 2002a). Zelo različna okolja so se razvrstila blizu skupaj. Tako so bile blizu skupaj knjižnica Pacifiškega oceana (Hongxiang in sod., 2008) ter jame Tito Bustillo (Schabereiter Gurtner in sod., 2002b) in npr. Ljubljansko barje I (Kraigher in sod., 2006), ki je bila zelo podobna jamski knjižnici Niu (Zhou in sod., 2007) ter Frasassi II (Jones in sod., 2008). Verjetno bi se s še večjim naborom knjižnic premešanost okolij še bolj pokazala.

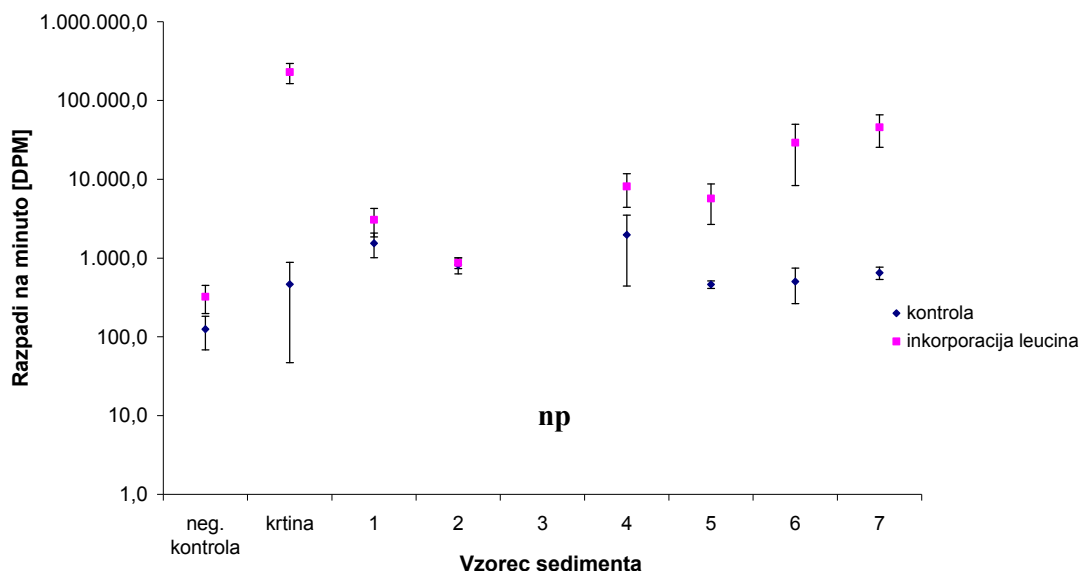


**Slika 11:** Ordinacija (NM-MDS) klonskih knjižnic iz različnih okolij s programom PAST (Hammer in sod., 2001).

#### 4.7 INKORPORACIJA RADIOAKTIVNO OZNAČENEGA $^{14}\text{C}$ -LEUCINA

Z inkorporacijo radioaktivno označenega leucina po modificirani metodi, ki so jo opisali Bååth in sodelavci (2001) smo ugotavljali mikrobnost aktivnost v posameznem vzorcu. Povprečne vrednosti DPM in standardnih odklonov so podane v **Prilogi D**. Količina vzorca

3 je bila premajhna, da bi lahko izmerili mikrobnost. **Slika 12** prikazuje povprečne vrednosti DPM v posameznem vzorcu s standardnim odklonom.



**Slika 12:** Inkorporacija radioaktivno označenega leucina v sedimentih Postojnske jame. 1 – star sediment <700.000 let, 2 – mlajši sediment ~20.000 let, 3 – stenske tvorbe Vermikuliti (stabilna klima), 4 – sediment na prevojni točki (stabilna klima), 5 – razpokan sediment (sprememba klime, redko poplavljenno območje), 6 – sediment z dna občasno poplavljenne struge, 7 – sediment s turistične poti (občasno poplavljenno območje). Napake prikazujejo eno standardno deviacijo.

V kontrolnih oz. inhibiranih vzorcih s TCA je bila aktivnost ustavljena v primerjavi s proučevanimi vzorci. Največja aktivnost je bila po pričakovanjih v pozitivni kontroli vzorca krtine 228.965,8 DPM, najnižja pa v negativni kontroli (destilirana voda) 323,0 DPM. V vzorcu 1 je bila večja mikrobnost (3.058,2 DPM) kot v vzorcu 2 (870,8 DPM), vendar pa je bilo tudi ozadje na delce vezanega  $^{14}\text{C}$ -Leu večje. Iz grafa je razvidno, da se je aktivnost povečevala od starejših proti mlajšim sedimentom, vendar je bila v primerjavi z vzorcem krtine vsaj 5 x nižja, saj ni dosegla več kot 45.539,8 DPM.



#### 4.8 DELEŽ VARIABILNOSTI SESTAVE IN AKTIVNOSTI BAKTERIJSKIH MIKROBNIH ZDRUŽB V ODVISNOSTI OD OKOLJSKIH IN PROSTORSKIH PARAMETROV

Od vseh izmerjenih okoljskih dejavnikov so bili statistično signifikantno povezani s sestavo mikrobne združbe ( $p < 0.002$ ) starost sedimenta, vsebnost dušika ter prisotnost skorje na površju in so skupaj razložili 87,5 % variabilnosti sestave mikrobne združbe. Klima, vsebnost ogljika ter poroznost pa so bili pomembno povezani z mikrobno aktivnostjo ( $p < 0.002$ ) in so skupno razložili 83,1 % variabilnosti v mikrobni aktivnosti. Za ugotavljanje dejanskega deleža vpliva okoljskih dejavnikov in prostorske razporeditve mest vzorčenj na sestavo bakterijskih mikrobnih združb in mikrobno aktivnost smo pripravili štiri tabele, ki so zajemale podatke o okoljskih in prostorskih parametrih, aktivnosti ter sestavi mikrobnih združb. S programom CANOCO (Lepš in Šmilauer, 2003) smo določili posamezne deleže za razlago variabilnosti. V **Preglednici 10** so prikazani deleži razložene variabilnosti v sestavi in aktivnosti bakterijskih mikrobnih združb.

**Preglednica 10:** Delež variabilnosti v aktivnosti in sestavi bakterijskih mikrobnih združb.

	Delež razložene variabilnosti [%]	
	Aktivnost	Sestava mikrobnih združb
<b>Okoljski parametri</b>	12,7	11,3
<b>Prostorski parametri</b>	16,9	12,5
<b>Kovariabilnost med okoljskimi in prostorskimi parametri</b>	70,4	76,2
<b>Skupna variabilnost</b>	100	100

Podatki uporabljeni za izračun deleža variabilnosti v sestavi in aktivnosti bakterijskih mikrobnih združb so podani v **Prilogi E**.

Iz rezultatov je razvidno, da so bili okoljski in prostorski parametri v obeh primerih med seboj tesno povezani in odvisni eden od drugega. Velik delež okoljskih parametrov je bil prostorsko strukturiran. Ta skupna variabilnost je vsaj delno posledica odnosa med biološkimi spremenljivkami (sestava mikrobne združbe, aktivnost) ter prostorsko strukturiranimi okoljskimi dejavniki.

Za razlago variabilnosti mikrobne aktivnosti se je po korekciji na soodvisnost s prostorsko razporeditvijo od vseh okoljskih dejavnikov kot najpomembnejša izkazala poroznost, v primeru bakterijske sestave pa starost sedimentov, ki pa sta razložili le majhen delež variabilnosti mikrobnih združb in aktivnosti (**Preglednica 10**). Zato glede na dobljene rezultate ne moremo trditi, da sta sestava mikrobnih združb in njihova aktivnost medsebojno povezani.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Z molekularnimi metodami smo želeli preučiti sestavo bakterijske mikrobne združbe ter izmeriti bakterijsko aktivnost v sedimentih iz Postojnske jame. Z določitvijo fizikalno kemijskih dejavnikov okolja in prostorskih parametrov smo poskušali ugotoviti, kakšen je njihov vpliv na sestavo in aktivnost bakterijske mikrobne združbe v posameznem vzorcu.

Najprej smo opisali fizikalno-kemijske in prostorske dejavnike mest vzorčenja. Celokupnega ogljika in dušika je bilo v vzorcih malo. Delež dušika je bil med 0,050 in 0,0175 %, delež ogljika pa med 0,307 in 3,220 %. Sklepamo lahko, da najstarejši sediment predstavlja najbolj oligotrofno okolje. Zanimivo je, da je bilo v sedimentu z dna občasno poplavljenе struge in turistične poti manj dušika kot v razpokanem sedimentu in manj ogljika kot v sedimentu s prevojne točke. Glede na to, da sta območji večkrat poplavljeni, bi tu pričakovali višje koncentracije C in N.

Z izračunom gostote in poroznosti vzorcev smo ugotovili, da so trije vzorci po gostoti ustrezali mineralnim prstem, katerih gostota je med 1,00 in 1,80 Mg/m<sup>3</sup>, da je bil najbolj zbit sediment prevojne točke, najmanj pa sediment z dna občasno poplavljenе struge.

Analiza in določitev teksture sedimentov s programom ImageJ (Schmid in sod., 2010; Abramoff in sod., 2004) je pokazala prisotnost delcev v velikostnem razredu melja (s povprečnim premerom ~ 0,01mm) v vseh vzorcih sedimenta. Za klasično opredelitev teksturnih razredov s sedimentacijskimi analizami bi potrebovali veliko večje (500 x večje) količine vzorcev, kar pa zaradi omejitve količine odvzema vzorcev s strani Zavoda za kulturno dediščino žal ni bilo mogoče.

Pri štetju barvanih bakterijskih celic s propidijevim jodidom pod epifluorescentnim mikroskopom smo po pregledu preparatov sedimenta starega ~ 20.000 let sicer lahko prepoznali posamezne bakterijske celice, vendar pa je bilo število celic na vidno polje

premajhno za kakršnekoli utemeljene izračune skupnega števila celic. Bakterijske celice so bile tudi zelo nehomogeno razporejene, zaradi česar je bila določitev koncentracije bakterij v vzorcu nemogoča. Zato smo v nadaljevanju uporabili metodi barvanja z DAPI in FISH (López López in sod., 2010), ki sta optimizirani za oligotrofne sedimente, kjer je potrebno celice s silo odtrgati z delcev sedimenta. S to tehniko smo lahko ocenili, da število bakterijskih celic v vzorcih ni preseglo  $10^4$  celic na gram sedimenta. Za ugotovitev natančnejšega števila celic bi za nadaljnje optimizacije potrebovali vzorce bistveno večje velikosti, tudi več sto gramov.

Podobnost bakterijskih profilov smo sprva želeli ugotoviti z metodo T-RFLP, vendar po končani restrikciji in analizi rezultatov v vzorcih nismo pridobili zadostnega števila fragmentov ustrezne velikosti. Zato smo se odločili za alternativno metodo LH PCR. Pri tej metodi smo uporabili začetna oligonukleotida 6FAM-27f in R534. Tako smo pridobili različno dolge produkte PCR. S programom Bionumerics (Applied Maths, 2010) smo na podlagi dobljenih produktov PCR ugotovili podobnost med nastalimi bakterijskimi profili. Pri pomnoževanju genov za 16S rRNK iz posameznih vzorcev smo pričakovali pomnožke dolge približno 500 baznih parov (bp). Po ločevanju z gelsko elektroforezo smo v vseh vzorcih lahko odkrili produkte s pričakovano velikostjo. Točno dolžino pomnožkov v posameznem vzorcu smo določili s kapilarno elektroforezo. Pomnožki so bili dolgi od 462 do 583 bp. Za optimalno analizo z LH PCR smo posamezne vzorce ustrezno redčili, da smo v vseh dobili enako količino produkta. Odkrili smo tri ohranjene gruče. Prvo gručo so predstavljali vzorec poplavljenе struge (vzorec 6) ter kontrolnih globokih peščenih tal (krtina), drugo sediment na prevojni točki ter razpokan sediment (vzorca 4 in 5), tretjo pa najstarejši sediment (1) ter sediment s turistične poti (7). Vejanje vzorcev 2 in 3 (sediment star ~ 20.000 let ter Vermikuliti) je bilo spremenljivo. Povezanost vzorca 6 in krtine kaže na prisotnost mikrobnih skupin, ki so sicer prisotne v globokih tleh. Vejanost dendrograma kaže na precejšnje razlike med posameznimi vzorci, in da vzorec 6 (dno občasno poplavljenе struge) ter krtina predstavljata bolj zunanje veje.

Pri medsebojni primerjavi knjižnic s programom PAST (Hammer in sod., 2001) smo ugotovili, da sta si knjižnici sedimenta s prevojne točke in stenskih tvorb Vermikulitov med seboj podobni ter hkrati podobni knjižnici bakterijskih kolonij na steni Pajsarjeve

jame (Pašič in sod., 2009). Knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let je izstopala, saj je bila precej oddaljena od ostalih knjižnic. Najbližja po podobnosti ji je bila knjižnica rdečega pigmenta odvzetega s paleolitskih slik španske jame Altamira I (Schabereiter Gurtner in sod., 2002a). Za trditev, da gre za v času zamrznjeno strukturo mikrobne združbe, v tem trenutku nimamo dovolj dokazov. Večina drugih okolij (tla, morski sedimenti, arktična tla, mangrove), ki smo jih primerjali, odstopa od jamskih knjižnic. Pojavili so se izven skupine jamskih okolij. Izjemi sta bili knjižnica Ljubljansko barje I (Kraigher in sod., 2006), ki je bila zelo podobna jamski knjižnici Niu (Zhou in sod., 2007) s Kitajske in Frasassi II (Jones in sod., 2008) iz Italije, ter knjižnica globokomorskega sedimenta Pacifiški ocean (Hongxiang in sod., 2008), ki je bila po sestavi zelo podobna jamski knjižnici Tito Bustillo (Schabereiter Gurtner in sod., 2002b) ter posredno tudi našim sedimentom Postojnske jame. Poleg tega je iz grafa tudi razvidno, da so bile knjižnice iz enakih okolij med seboj zelo različne, zaradi česar je malo verjetno, da bi obstajali za jame specifični mikroorganizmi, ki bi predstavljali jamsko-specifične razvojne linije, kot je bilo predlagano (Pašič in sod., 2010). To smo tudi potrdili z neparametričnim testom razlik (NP-MANOVA) med skupino vseh klonskih knjižnic iz jamskega okolja ter skupino klonskih knjižnic iz preostalih okolij ( $p > 0,05$ ; skupna vsota kvadratov = 6,239; vsota kvadratov znotraj skupine = 5,804; število permutacij = 1000), ki temelji na izmerjenih razdaljah med skupinami.

Za ugotavljanje aktivnosti bakterijskih mikrobnih združb smo uporabili metodo inkorporacije radioaktivno označenega leucina po protokolu, ki so ga opisali Bååth in sodelavci (2001). Mikrobna aktivnost v vzorcih jamskega sedimenta je naraščala od najstarejšega proti najmlajšemu sedimentu, vendar ni presegla 45.539,8 DPM. Iz rezultatov nismo mogli natančno določiti razlik v mikrobni aktivnosti med najstarejšima sedimentoma, saj so se vrednosti napak prekrivale med vzorcema ter med negativnimi kontrolami in eksperimentalnimi meritvami. Tako ne moremo trditi, da je aktivnost mikroorganizmov v teh dveh vzorcih večja od izmerjenega ozadja. Za določitev, ali so mikroorganizmi v tako starih jamskih vzorcih dejansko aktivni, bi potrebovali bistveno daljše čase inkubacije od 24 ur. V nadaljevanju tega dela predlagamo vzorčenje večjih količin sedimentov ter večmesečne inkubacije z večjim številom vzorcev (Rivkina in sod., 2000). Za natančno ugotovitev, katere od zaznanih mikrobnih skupin so dejansko aktivne,

za bodoče raziskave predlagamo SIP ali NanoSIMS (Li in sod., 2008; Musat in sod., 2008).

Na podlagi podatkov o okoljskih in prostorskih parametrih, aktivnosti in sestavi bakterijskih mikrobnih združb smo v zaključku dela poskušali ugotoviti, kateri dejavniki okolja so najpomembnejši za razlago mikrobne sestave in aktivnosti. Pomembni okoljski dejavniki, ki so vplivali na sestavo bakterijskih združb v jamskih sedimentih Postojnske jame, so bili starost sedimenta, vsebnost N in prisotnost skorje, v primeru aktivnosti pa poroznost, vpliv klime in vsebnost C. Vendar pa smo po pregledu povezanosti okoljskih in prostorskih dejavnikov ugotovili velik delež kovariabilnosti med okoljskimi in prostorskimi parametri, tako v primeru sestave bakterijskih združb kot tudi v primeru aktivnosti. To kaže, da je velik del okoljskih parametrov že prostorsko strukturiran. Po odstranitvi deleža variabilnosti na račun kovariabilnosti med prostorom in okoljem sta največji vpliv na razlike v sestavi in aktivnosti bakterijskih združb od vseh dejavnikov imela le starost sedimenta ter poroznost. Nadaljnje merjenje okoljskih dejavnikov nam tako najverjetneje ne bo podalo novih odgovorov. Tako velike razlike v okoljskih dejavnikih na tako kratkih razdaljah kažejo na lokalno heterogenost jamskih habitatov.

Naša analiza je edinstvena do sedaj, saj kot prva analizira prostorsko raznolikost sestave mikrobnih združb, njihovo aktivnost in za mikroorganizme relevantne okoljske dejavnike v jami na velikostni skali nekaj 10 m. Domnevamo, da bi z raziskavami prostorske raznolikosti mikrobnih združb, njihove aktivnosti ter okoljskih dejavnikov v drugih delih Postojnske jame in/ali drugih jamah po svetu lahko natančneje opredelili glavne dejavnike, ki strukturirajo združbe in določajo mikrobno aktivnost. Možno je, da bi z večanjem števila vzorcev prišli do drugačnih ugotovitev. Vendar se nam to zdi malo verjetno, saj se v splošnem s staranjem sedimentov počasi izčrpavajo tudi geokemijski potenciali za različne oblike litotrofije, čemur bi se skozi čas mikrobne združbe lahko prilagajale. Za izmenjave plinov in vlage v tleh je poroznost sedimentov ključna, saj to neposredno vpliva na mikrobno aktivnost. Na osnovi dobljenih rezultatov v tej študiji ter pregleda literature ugotavljamo, da smo kot prvi opisali ključne jamske zakonitosti, ki strukturirajo mikrobne združbe ter regulirajo njihovo aktivnost.

## 5.2 SKLEPI

- V nasprotju s prvo hipotezo  $H_0$ , se sestava in aktivnost proučevanih mikrobnih združb med vzorci signifikantno razlikujeta. Zato lahko prvo hipotezo  $H_0$  zavržemo.
- V nasprotju z drugo hipotezo  $H_0$  smo ugotovili, da se okoljski dejavniki med vzorci signifikantno razlikujejo. Zato lahko drugo hipotezo  $H_0$  zavržemo.
- Sprejmemo alternativno hipotezo  $H_1$ .
- Ni signifikantnih razlik med klonskimi knjižnicami gena za 16S rRNK iz različnih okolij. V jamah torej ne pričakujemo specifičnih jamskih združb, ki v talnih ali sedimentih vzorcih ne bi bile prisotne.
- Okoljski dejavnik, ki ima največji vpliv na spremembe v sestavi bakterijske združbe, je starost, na aktivnost pa najbolj vpliva poroznost sedimenta. Visok delež kovariabilnosti med okoljem in prostorom kaže, da je velik del okoljskih parametrov prostorsko strukturiran. Z oddaljenostjo se spreminjajo tudi okoljski parametri, ki vplivajo na mikrobne združbe.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli preučiti raznolikost mikrobne bakterijske združbe v jamskih sedimentih iz Postojnske jame z molekularnimi tehnikami, ugotoviti kakšna je podobnost profilov bakterijskih združb med vzorci, izmeriti mikrobno aktivnost, ugotoviti fizikalno kemijske dejavnike okolja, prostorske parametre, teksturo sedimentov in ugotoviti koncentracijo bakterij v vzorcih.

Delež izmerjenega celokupnega ogljika in dušika v vzorcih je bil nizek in primerljiv med vzorci, kar kaže na visoko stopnjo oligotrofije v jamskem okolju. Najnižjo vsebnost ogljika in dušika smo določili v najstarejšem vzorcu.

Analiza in določitev teksture sedimentov s programom ImageJ (Schmid in sod., 2010; Abramoff in sod., 2004) je pokazala prisotnost delcev v velikostnem razredu melja s povprečnim premerom  $\sim 0,01\text{mm}$  v vseh vzorcih.

S štetjem bakterijskih celic barvanih s propidijevim jodidom smo pod epifluorescentnim mikroskopom po pregledu preparatov sedimenta starega  $\sim 20.000$  let lahko razločili posamezne bakterijske celice. Število bakterijskih celic je bilo premajhno in premalo homogeno razporejeno za opredelitev koncentracije bakterij v vzorcu. V nadaljevanju smo z metodama DAPI in FISH (López López in sod., 2010) ocenili, da število bakterijskih celic v vzorcu ne presega  $10^4$  bakterijskih celic na gram sedimenta.

Podobnost bakterijskih profilov je bila pri obeh proučevanih serijah vzorcev podobna. Določili smo tri ohranjene gruče, in sicer gručo vzorca občasno poplavljenе struge (vzorec 6) ter kontrolnega vzorca globokih peščenih tal (krtina), gručo sedimenta prevojnę točke (vzorec 4) in razpokanę sedimenta (vzorec 5) ter gručo najstarejšę sedimenta (vzorec 1) in sedimenta s turistične poti (vzorec 7). Vejanje sedimenta starega  $\sim 20.000$  let (vzorec 2) in stenskih tvorb Vermikulitov (vzorec 3) je bilo spremenljivo.



Sekvence klonskih knjižnic 16S rDNK so pokazale, da se v sedimentih Postojnske jame pojavlja 11 različnih bakterijskih debel, večji delež neuvrščeni bakterij in manjši delež neznanih organizmov. V vseh treh knjižnicah je največji delež predstavljalo bakterijsko deblo *Proteobacteria*, v manjšem deležu pa so bila prisotna še debela *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, OD1, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* in *Nitrospira*.

Z inkorporacijo radioaktivno označenega leucina smo ugotavljali mikrobo aktivnost v vzorcih jamskih sedimentov. Bakterijske aktivnosti v najstarejših dveh vzorcih na podlagi rezultatov nismo mogli potrditi. V mlajših sedimentih je aktivnost bila prisotna, vendar kljub temu vsaj 5 x manjša od kontrolnega vzorca krtine.

Z ugotovitvijo okoljskih in prostorskih parametrov smo ugotavljali delež variabilnosti bakterijske združbe in aktivnosti. Ključni okoljski dejavnik, ki je vplival na sestavo bakterijske združbe v sedimentih Postojnske jame, je bila starost sedimenta, na aktivnost pa je ključno vplivala poroznost sedimenta. Izračunana kovariabilnost med prostorskimi in okoljskimi parametri je bila visoka (70,4 % v primeru bakterijske mikrobne aktivnosti in 76,2 % v primeru sestave bakterijske mikrobne združbe), kar kaže, da je velik delež okoljskih parametrov že prostorsko strukturiran.

## 7 VIRI

Abramoff M.D., Megehaes P.J., Ram S.J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11, 7: 36 – 42  
<http://rsbweb.nih.gov/ij/> (januar 2010)

Aislabie J.M., Chhour K.L., Saul D.J., Miyauchi S., Ayton J., Paetzold R.F., Balks M.R. 2006. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 3041 – 3056

Applied Biosystems. 2009. Peak scanner software, version 1.0. Foster City, AB – Applied Biosystems: 88 str.  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042751.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042751.pdf) (december 2009)

Applied Maths. 2010. BioNumerics. Austin, Applied Maths: 1 str.  
<http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm> (januar 2010)

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

Bååth E. 1994. Measurement of protein synthesis by soil bacterial assemblages with the leucine incorporation technique. *Biology and Fertility of Soils*, 17: 147 – 153

Bååth E., Pettersson M., Söderberg K.H. 2001. Adaptation of a rapid and economical microcentrifugation method to measure thymidine and leucine incorporation by soil bacteria. *Soil & Biochemistry*, 33: 1571 – 1574

Bakken L.R. 1985. Separation and purification of bacteria from soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 6: 1482 – 1487

Barron S.K., Murdock C.A., Barron B.B.G., Blair B., Meade M.E., Barger W.T. 2010. Analysis of bacterial diversity in soils from Blowing Spring Cave (Lauderdale County, AL). *Journal of the Alabama Academy of Science*, 1: 1 - 8

Barton H.A. 2006. Introduction to cave microbiology: A review for the non – specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68, 2: 43 – 54

Barton H. A., Jurado V. 2007. What's up down there: Microbial diversity in starved cave environments. *Microbe*, 2: 132 – 138

Bastian F., Alabouvette C., Saiz Jimenez C. 2008. Bacteria and free – living amoeba in the Lascaux Cave. *Research in Microbiology*, 160: 38 – 40

Brito E.M.S., Guyoneaud R., Goñi Urriza M., Ranchou Peyruse A., Verbaere A., Crapez M.A.C., Wasserman J.C.A., Duran R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, 157: 752 – 762

Cassery C., Erijman L. 2003. Molecular monitoring of microbial diversity in an UASB reactor. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52: 7 – 12

CodonCode Aligner. 2002. Better software for DNA sequencing. Dedham, CodonCode Corporation: 6 str.

<http://www.codoncode.com/> (september 2010)

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2009. The ribosomal database project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 37: 141 - 145

Connon S.A., Lester E.D., Shafaat H.S., Obenhuber D.C., Ponce A. 2007. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research*, 112: 1 - 9

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. 2006a. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 5069 - 5072

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R., Andersen G.L. 2006b. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 34: 394 - 399

Douglas S. 2005. Mineralogical footprints of microbial life. *American Journal of Science*, 305: 503 – 525

Fermentas Life Sciences. 2010. CloneJET™ PCR cloning kit. Sticky-end cloning protocol. Maryland, Fermentas Life Sciences: 15 str.

[http://www.fermentas.de/product\\_info.php?info=p1610](http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p1610) (marec 2010)

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

Greengenes. 2010. 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Berkeley, Greengenes: 1 str.

<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi> (junij 2010)

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

Hinsa Leasure S.M., Bhavaraju L., Rodrigues J.L., Bakermans C., Gilichinsky D.A., Tiedje J.M. 2010. Characterization of a bacterial community from a Northeast Siberian seacoast permafrost sample. *FEMS Microbiology Ecology*, 74: 103–113

Hongxiang X., Junyi Y., Xiaogu W., Min W., Chunsheng W. 2008. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecologica Sinica*, 28, 2: 479 – 485

Ivanovich M., Harmon R.S. 1992. Uranium series disequilibrium: Applications to environmental problems. 2<sup>ed</sup> ed. Clarendon, Oxford Science Publications: 910 str. Cit. po Zupan Hajna N., Mihevc A., Pruner P., Bosák P. 2008b. Palaeomagnetism and magnetostratigraphy of Karst sediments in Slovenia, (*Carsologica* 8). Ljubljana, ZRC SAZU: 266 str.

ISO 10694. Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis). 2010: 5 str.

Jones D.S., Lyon E.H., Macalady J.L. 2008. Geomicrobiology of biovermiculations from the Frasassi Cave System, Italy. *Journal of Cave and Karst Studies*, 70, 2: 78 – 93

Jüttner F. 1984. Dynamics of the volatile organic substances associated with *Cyanobacteria* and *Algae* in a eutrophic shallow lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 4: 814 – 820

Kim J.S., Crowley D.E., Buerkert A. 2010. Bacterial communities from soil sediments of mountain oasis in northern Oman. *Catena*, 82: 102 – 111

Kirchman D., K'Neas E., Hodson R. 1985. Leucine incorporation and its potential as a measure of protein synthesis by bacteria in natural aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 3: 599 – 607

- Kirchman D. 2001. Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. *Methods microbiology*, 30: 227–237
- Kormas K.Ar., Smith D.C., Edgcomb V., Teske A. 2003. Molecular analysis of deep subsurface microbial communities in Nankai Trough sediments (ODP Leg 190, Site 1176). *FEMS Microbiology Ecology*, 45: 115 – 125
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., D. van Elsas J., Mandič Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 2762 – 2771
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. V: Stackebrandt E., Goodfellow M., (eds.). New York , Wiley: 115 – 175
- Lepš J., Šmilauer P. 2003. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge, Cambridge University Press: 280 str.
- Li T., Wu T.D., Mazéas L., Toffin L., Guerquin-Kern J.L., Leblon G., Bouchez T. 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environmental Microbiology*, 10, 3: 5880 – 588
- López – López A., Yarza P., Richter M., Suárez – Suárez A., Antón J., Niemann H., Rosseló – Móra R. 2010. Extremely halophilic microbial communities in anaerobic sediments from a solar saltern. *Environmental Microbiology Reports*, 2, 2: 258 – 271
- Macalady J.L., Lyon E.H., Koffman B., Albertson L.K., Meyer K., Galdenzi S., Mariani S. 2006. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 8: 5596 – 5609

Malneršič M. 2010. Vpliv cinamaldehida in monenzina na rast izbranih vampnih bakterij. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 80 str.

Miller R.W., Donahue R.L. 1990. Soils: An introduction to soils and plant growth. 6<sup>th</sup> ed. New Jersey, Englewood Cliffs, Prentice Hall Inc.: 60 str.

MO BIO. 2009. Ultraclean<sup>TM</sup> soil DNA isolation kit. Instruction manual (new alternative protocol maximizes yield). Carlsbad, MO BIO Laboratories, inc.: 8 str.  
<http://www.mobio.com/> (oktober 2009)

Mulec J. 2008. Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian Karst caves. Acta Carsologica 37, 1: 153 – 160

Mulec J., Zalar P., Zupan Hajna N., Rupnik M. 2002. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). Acta Carsologica, 31, 2: 177 – 187

Musat N., Halm H., Winterholler B., Hoppe P., Peduzzi S., Hillion F., Horreard F., Amann R., Jørgensen B.B., Kuypers M.M.M. 2008. A single – cell view on the ecophysiology of anaerobic phototrophic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 46: 17861 – 17866

Nagy L.M., Pérez A., Garcia Pichel F. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument, AZ). FEMS Microbiology Ecology, 54: 233 – 245

NCBI. 2010. Nucleotide: Alphabet of life. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: 4 str.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (junij 2010)

Pašić L., Kovče B., Sket B., Herzog Velikonja B. 2009. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 71: 50 – 60

Pettersson M., Pietikäinen J., Bååth E. 2004. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 49 – 58

Portillo M.C., Gonzalez J.M. 2008. Sulfate – reducing bacteria are common members of bacterial communities in Altamira Cave (Spain). *Science of the Total Environment*, 407: 1114 – 1122

Portillo M.C., Saiz Jimenez C., Gonzalez J.M. 2008. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of “white colonizations” in the Altamira Cave, Spain. *Research in Microbiology*, 160: 41 – 47

RDP II. 2010. Ribosomal database project. East Lansing, Ribosomal Database Project: 10 str.

<http://rdp.cme.msu.edu/> (april 2010)

Rivkina E., Friedmann E. I., McKay C., Gilichinsky D. 2000. Microbial activity of permafrost bacteria below the freezing point. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3230-3234

Roche. 2008. High pure PCR product purification kit. Mannheim, Roche: 9 str.

<https://www.roche-applied-science.com> (november 2009)

Schabereiter Gurtner C., Saiz Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2003. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiology Ecology*, 47: 235 – 247



Schabereiter Gurtner C., Saiz Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2002a. Altamira cave Paleolithic paintings harbour partly unknown bacterial communities. *FEMS Microbiology Letters*, 211: 7 – 11

Schabereiter Gurtner C., Saiz Jimenez C., Piñar G., Lubitz W., Rölleke S. 2002b. Phylogenetic 16S rRNA analysis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology*, 4, 7: 392 – 400

Schmid B., Schindelin J., Cardona A., Longair M., Heisenberg M. 2010. A high level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics*, 11: 274 – 281

Summers Engel A., Porter L.M., Stern L.A., Quinlan S., Bennett P.C. 2004. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “*Epsilonproteobacteria*”. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 31–53

Summers Engel A., Meisinger D.B., Porter M.L., Payn R.A., Schmid M., Stern L.A., Schleifer KH, Lee N.M. 2009. Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiralling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *The ISME Journal*, 4: 98 – 110

Tkavc R. 2007. Identifikacija in genotipizacija entomopatogenih gliv izoliranih iz troglofilnih metuljev *Scoliopteryx libatrix* L. in *Triphosa dubitata* L. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 80 str.

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261 - 5267.

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

White W.B. 2007. Cave sediments and paleoclimate. *Journal of Cave and Karst Studies*, 69, 1: 76 – 93

Zhang H., Sekiguchi Y., Hanada S., Hugenholz P., Kim H., Kamagata Y., Nakamura K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate – accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1155 – 1163

Zhou J., Gu Y., Zou C., Mo M. 2007. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth – cave in Guihou Province, Southwest of China. *Journal of Microbiology*, 45, 2: 105 – 112

Zupan Hajna N., Mihevc A., Pruner P., Bosák P. 2008b. Palaeomagnetism and magnetostratigraphy of Karst sediments in Slovenia, (*Carsologica* 8). Ljubljana, ZRC SAZU: 266 str.

Zupan Hajna N., Pruner P., Mihevc A., Schnabl P., Bosák P. 2008a. Cave sediments from the Postojnska – Planinska Cave System (Slovenia): Evidence of multi – phase evolution in ephreatic zone. *Acta Carsologica*, 37, 1: 63 – 86

QIAGEN. 2009. QIAquick spin handbook. QIAquick gel extraction kit protocol using a microcentrifuge. Valencia, QIAGEN Inc.: 36 str.

[http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN\\_QIAquickSpin\\_EN.pdf](http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAquickSpin_EN.pdf)

(marec 2010)

## **ZAHVALA**

Doc. dr. Stres Blažu – za vse usmeritve in strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Dr. Mulec Janezu – za identifikacijo transekta v Postojnski jami, pridobitev vseh dovoljenj za odvzem sedimentnega materiala iz Postojnske jame ter vso nedostopno literaturo in neobjavljene rezultate.

Prof. dr. Avguštin Gorazdu – za recenzijo diplomske naloge

Dr. Turk Valentini (Morska biološka postaja Piran) – za izvedbo naše optimizirane metode inkorporacije radioaktivno označenega leucina.

Dr. Suarez-Suarez Ani, dr. Lopez-Lopez Arantxi ter dr. Rossello-Mora Ramonu z instituta IMEDEA-CSIC – za pomoč pri izvedbi metod barvanja bakterijskih celic z DAPI in po FISH.

Podjetju Educell d.o.o. – za laboratorijski material.

Moji družini – za podporo in spodbujanje skozi celoten študij ter, da so skozi ves ta čas verjeli vame.

Simonu – za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge, spodbudo, razumevanje in moralno podporo.

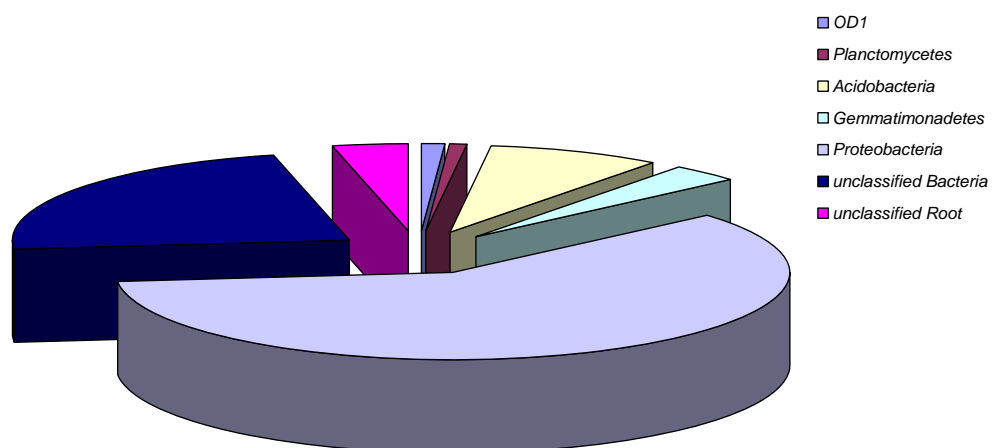
## PRILOGE

### Priloga A: Prostorski parametri Postojnske jame.

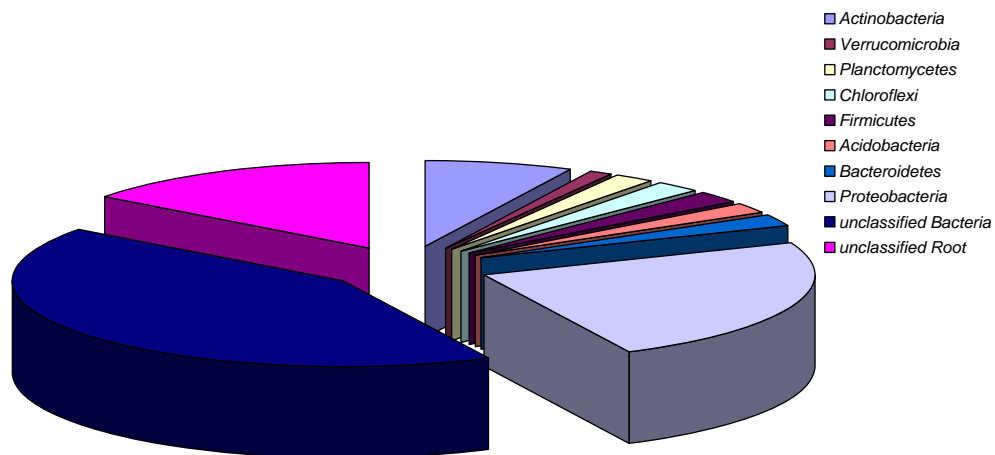
Razdalja med vzorcema	Razdalja [m]	vzorec	Višina [m]
1 – 2	2,0	1	11,3
2 – 3	2,4	2	9,3
3 – 4	12,4	3	10,3
4 – 5	7,6	4	4,2
5 – 6	5,8	5	1,8
6 – 7	6,9	6	0,0
		7	0,3

**Priloga B:** Grafični prikaz zastopanosti posameznih debel v sedimentih Postojnske jame.

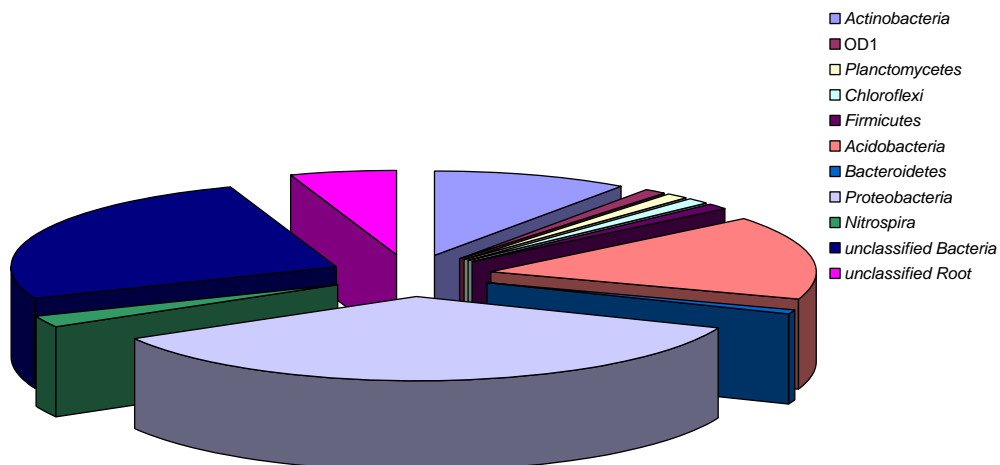
**Priloga B1:** Klonska knjižnica sedimenta starega ~ 20.000 let.



### Priloga B2: Klonska knjižnica sedimenta s prevojne točke.



### Priloga B3: Klonska knjižnica stenskih tvorb Vermikulitov.



**Priloga C:** Seznam sekvenc 16S rRNK uporabljenih za primerjavo s programom PAST (Hammer in sod., 2001).

<b>Ime knjižnice</b>	<b>GenBank accession number</b>	<b>Vir</b>
Pajsarjeva jama	FJ535064 - FJ535113	Pasić in sod., 2009
Lower Kane I cave	AM490641 - AM490771	Summers Engel in sod., 2009
Lower Kane II cave	AY208806 - AY208817 AY510166 - AY510267	Summers Engel in sod., 2004
Altamira I cave	AJ421890 - AJ421911	Schabereiter Gurtner in sod., 2002a
Altamira II cave	AY960228 EF188305 - EF188307 EF188310, EF188312 - EF188333 EF188338 - EF188350 EF188514 - EF188548 EF188593, EF188599 EF188612, EF188619, EF188627, EF188673, EF188682, EF188689, EF188693, EF188702, EF188773, EF188793 - EF188802	Portillo in sod., 2008
Altamira III cave	EF188466-68, EF188474-75, EF188477-78, EF188725-26, EF188736, EF188738-46, EF188449-59, EF188462-65, EF188470-73, EF188476, EF188479, EF188687-92, EF188694-95, EF188707-09, EF188711-16, EF188724,	Portillo in Gonzalez, 2008

**Nadaljevanje Priloga C:** Seznam sekvenc 16S rRNK uporabljenih za primerjavo s programom PAST (Hammer in sod., 2001).

	EF188728-35, EF188747	
Niu cave	EF141837 - EF141978	Zhou in sod., 2007
Carlsbad cave	DQ066600 - DQ066618	
	DQ228711 - DQ228720	
Llonín in La Garma cave	AJ421153 - AJ421179	Schabereiter Gurtner in sod., 2003
	AJ421084 - AJ421141	
Tito Bustillo cave	AJ421180 - AJ421220	Schabereiter Gurtner in sod., 2002b
Frasassi I cave	DQ133908 - DQ133940	Macalady in sod., 2006
	DQ415745 - DQ415869	
Frasassi II cave	DQ499275 - DQ499330	Jones in sod., 2008
	EF530677 - EF530681	
Guapimirim mangrove	AJ871928 - AJ871959	Brito in sod., 2006
Ljubljansko barje I	AM168139 - AM168255	Kraigher in sod., 2006
Ljubljansko barje II	FJ405427 - FJ405580	Ausec in sod., 2009
Pacifiški ocean	EF061160 - EF031222	Hongxiang in sod., 2008
Nankai Trough	AY191324 - AY191357	Kormas in sod., 2003
	AY191321 - AY191323	
Victoria Land	DQ365987 - DQ365999	Aislabie in sod., 2006
	DQ366000 - DQ366018	
SV Sibirska obala	GU811061 - GU811146	Hinsa Leisure in sod., 2010
	GU932591 - GU932662	
Sonoran desert	AY647884 - AY647917	Nagy in sod., 2005
	AY823515 - AY823518	
	AY648699, AY61551,	
	AY833647	



**Nadaljevanje Priloga C:** Seznam sekvenc 16S rRNK uporabljenih za primerjavo s programom PAST (Hammer in sod., 2001).

Atacama desert	EF016791 - EF016829 EF016845 - EF016849	Connon in sod., 2007
Gorska oaza	DQ906773 - DQ906780, DQ906782 - DQ906787, DQ906789, DQ906791 - DQ906798, DQ906800 - DQ906802, DQ906804 - DQ906818, DQ906821 - DQ906822, DQ906825 - DQ906838, DQ906840 - DQ906841, DQ906843 - DQ906895, DQ906897 - DQ906918	Kim in sod., 2010

**Priloga D:** Povprečne vrednosti DPM in standardnih deviacij – inkorporacija radioaktivno označenega leucina.

<b>vzorec</b>	<b>kontrola [DPM]</b>	<b>inkorporacija [DPM]</b>	<b>SD [DPM]</b>	<b>kontrola</b>	<b>SD inkorporacija [DPM]</b>
<b>neg.K</b>	125,2	323,0	57,0		125,4
<b>krtina</b>	464,0	228.965,8	416,9		65592,0
<b>vzorec 1</b>	1.541,5	3.058,2	529,4		1208,6
<b>vzorec 2</b>	817,0	870,8	188,4		137,9
<b>vzorec 3</b>	0,0	0,0	0,0		0,0
<b>vzorec 4</b>	1.973,2	8.107,0	1531,5		3691,8
<b>vzorec 5</b>	461,7	5.702,2	51,4		3023,8
<b>vzorec 6</b>	503,8	29.130,8	239,8		20842,7
<b>vzorec 7</b>	650,2	45.539,8	115,9		20116,6

**Priloga E:** Podatki za izračun deleža variabilnosti in aktivnosti v bakterijski mikrobnih združbi v sedimentih Postojnske jame.

**Priloga E1:** Podatki za okoljske parametre.

	poroznost	Db	vlačnost	N	C	C/N	klima	poplavno	globina	barva	skorja	starost	stena	sediment	turističnost	na površju
<b>vzorec 1</b>	0,48	1,30	0,11	0,050	0,307	6,14	1	0	1	3	0	1000	0	1	6	0
<b>vzorec 2</b>	0,50	1,10	0,17	0,171	1,607	9,397661	1	0	2	3	0	100	0	1	7	0
<b>vzorec 3</b>							1	0	0	2	0	2	1	0	5	1
<b>vzorec 4</b>	0,40	1,22	0,24	0,135	3,220	23,85185	1	0	0	1	1	1	0	1	4	1
<b>vzorec 5</b>	0,56	0,81	0,15	0,175	1,350	7,714286	0	1	0	1	1	1	0	1	3	1
<b>vzorec 6</b>	0,65	0,77	0,27	0,160	2,106	13,1625	0	2	0	1	1	1	0	1	2	1
<b>vzorec 7</b>	0,57	0,92	0,19	0,111	3,109	28,00901	0	2	0	1	0	1	0	1	1	1

**Priloga E2:** Podatki za aktivnost.

	aktivnost	Kontrola (x)	Eksperiment (y)	xy	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	x <sup>2</sup> y	xy <sup>2</sup>	x <sup>3</sup>	y <sup>3</sup>
<b>vzorec 1</b>	3058,2	125,1667	323	40428,83	15666,69	104329	5060342	13058513	1960948	33698267
<b>vzorec 2</b>	870,8	1541,5	3058,167	4714164	2376222	9352383	7,27E+09	1,44E+10	3,66E+09	2,86E+10
<b>vzorec 3</b>		817	870,8333	711470,8	667489	758350,7	5,81E+08	6,2E+08	5,45E+08	6,6E+08
<b>vzorec 4</b>	8107,0	1973,167	8107	15996462	3893387	65723449	3,16E+10	1,3E+11	7,68E+09	5,33E+11
<b>vzorec 5</b>	5702,2	461,6667	5702,167	2632500	213136,1	32514705	1,22E+09	1,5E+10	98397838	1,85E+11
<b>vzorec 6</b>	29130,8	503,8333	29130,83	14677085	253848	8,49E+08	7,39E+09	4,28E+11	1,28E+08	2,47E+13
<b>vzorec 7</b>	45539,8	650,1667	45539,83	29608482	422716,7	2,07E+09	1,93E+10	1,35E+12	2,75E+08	9,44E+13

### Priloga E3: Podatki za prostorske parametre.

- oddaljenost med vzorčevališči

	<b>oddalx</b>	<b>oddaly</b>	<b>oddalxy</b>	<b>oddalx2</b>	<b>oddaly2</b>	<b>oddalx3</b>	<b>oddalx2y</b>	<b>oddalxy2</b>	<b>oddaly3</b>
<b>vzorec 1</b>	0,08928	0,18745	0,016736	0,007971	0,035138	0,000712	0,001494	0,003137	0,006587
<b>vzorec 2</b>	0,01588	0,343894	0,005461	0,000252	0,118263	4E-06	8,67E-05	0,001878	0,04067
<b>vzorec 3</b>	0,05028	0,52023	0,026157	0,002528	0,270639	0,000127	0,001315	0,013608	0,140795
<b>vzorec 4</b>	0,22857	0,57644	0,131757	0,052244	0,332283	0,011941	0,030116	0,07595	0,191541
<b>vzorec 5</b>	0,77899	0,492985	0,38403	0,606825	0,243034	0,472711	0,299156	0,189321	0,119812
<b>vzorec 6</b>	0,822	0,353616	0,290672	0,675684	0,125044	0,555412	0,238933	0,102786	0,044218
<b>vzorec 7</b>	0,815	0,325385	0,265189	0,664225	0,105875	0,541343	0,216129	0,086288	0,03445

- višina mesta vzorčenja

	<b>visx</b>	<b>visy</b>	<b>visxy</b>	<b>visx2</b>	<b>visy2</b>	<b>visx2y</b>	<b>visxy2</b>	<b>visx3</b>	<b>visy3</b>
<b>vzorec 1</b>	0,03423	0,322437	0,011037	0,001172	0,103966	0,000378	0,003559	4,01E-05	0,033522
<b>vzorec 2</b>	0,04722	0,28298	0,013362	0,00223	0,080078	0,000631	0,003781	0,000105	0,02266
<b>vzorec 3</b>	0,05555	0,414732	0,023038	0,003086	0,172003	0,00128	0,009555	0,000171	0,071335
<b>vzorec 4</b>	0,2248	0,63179	0,142026	0,050535	0,399159	0,031928	0,089731	0,01136	0,252184
<b>vzorec 5</b>	0,84113	0,377044	0,317143	0,7075	0,142162	0,266759	0,119577	0,595099	0,053601
<b>vzorec 6</b>	0,77403	0,432116	0,334471	0,599122	0,186724	0,25889	0,14453	0,463739	0,080687
<b>vzorec 7</b>	0,82305	0,338893	0,278926	0,677411	0,114848	0,22957	0,094526	0,557543	0,038921

## Priloga E4: Podatki o sestavi mikrobne združbe.

- serija A

	<b>ax</b>	<b>ay</b>	<b>axy</b>	<b>ax2</b>	<b>ay2</b>	<b>ax2y</b>	<b>axy2</b>	<b>ax3</b>	<b>ay3</b>
<b>vzorec 1</b>	0,94006	0,62318	0,585827	0,883713	0,388353	0,550712	0,365075	0,830743	0,242014
<b>vzorec 2</b>	0,09585	0,410453	0,039342	0,009187	0,168472	0,003771	0,016148	0,000881	0,06915
<b>vzorec 3</b>	0,422226	0,19411	0,081958	0,178275	0,037679	0,034605	0,015909	0,075272	0,007314
<b>vzorec 4</b>	0,08331	0,412459	0,034362	0,006941	0,170122	0,002863	0,014173	0,000578	0,070169
<b>vzorec 5</b>	0,105	0,55334	0,058101	0,011025	0,306185	0,006101	0,032149	0,001158	0,169424
<b>vzorec 6</b>	0,23994	0,346834	0,083219	0,057571	0,120294	0,019968	0,028863	0,013814	0,041722
<b>vzorec 7</b>	0,91362	0,25962	0,237194	0,834702	0,067403	0,216705	0,06158	0,7626	0,017499

- serija B

	<b>bx</b>	<b>by</b>	<b>bxy</b>	<b>bx2</b>	<b>by2</b>	<b>bx2y</b>	<b>bxy2</b>	<b>bx3</b>	<b>by3</b>
<b>vzorec 1</b>	0,02303	0,908334	0,020919	0,00053	0,82507	0,000482	0,019001	1,22E-05	0,749439
<b>vzorec 2</b>	1,12338	0,78752	0,884684	1,261983	0,620188	0,993837	0,696707	1,417686	0,48841
<b>vzorec 3</b>	1,13382	0,921224	1,044502	1,285548	0,848654	1,184277	0,96222	1,45758	0,7818
<b>vzorec 4</b>	1,0252	1,04376	1,070063	1,051035	1,089435	1,097028	1,116889	1,077521	1,137109
<b>vzorec 5</b>	1,13129	0,943007	1,066814	1,279817	0,889262	1,206876	1,006013	1,447844	0,83858
<b>vzorec 6</b>	1,0135	0,865249	0,87693	1,027182	0,748656	0,888768	0,758763	1,041049	0,647774
<b>vzorec 7</b>	0,849782	0,830908	0,706091	0,722129	0,690408	0,600023	0,586696	0,613653	0,573666